Beiträge zur Kenntnis der Torulaceen.

Von der

K. Technischen Hochschule zu München zur Erlangung der Würde eines Doktors der technischen Wissenschaften (Doktor-Ingenieurs) genehmigte Dissertation.

Vorgelegt von

Julius Dachs
Diplom-Ingenieur.

Referent:
Prof. Dr. Carl Lintner.

Korreferent:
Prof. Dr. Andreas Lipp.

Tag der mündlichen Prüfung: 14. März 1908.

München 1908.

Druck von A. Fröhlich, München.

Beiträge zur Kenntnis der Torulaceen.

Von der

K. Technischen Hochschule zu München

zur Erlangung der Würde eines Doktors der technischen Wissenschaften (Doktor-Ingenieurs) genehmigte Dissertation.

Vorgelegt von

Julius Dachs

Diplom-Ingenieur.

ACAD. MONACENSIS BIBL.

Referent:
Prof. Dr. Carl Lintner.

Korreferent:
Prof. Dr. Andreas Lipp.

Tag der mündlichen Prüfung: 14. März 1908.

München 1908.

Druck von A. Fröhlich, München.

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit gewidmet.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555409_0009

Die vorliegende Arbeit ist im Oktober 1906 im physiologischen Laboratorium der wissenschaftlichen Station für Brauerei in München begonnen und im Wintersemester 1907|08 im gärungschemischen Laboratorium der kgl. technischen Hochschule in München vollendet worden. Es sei mir gestattet, meinen hochverehrten Lehrern, Herrn Prof. Dr. Will und Herrn Prof. Dr. Lintner, für das mir stets entgegengebrachte Wohlwollen und die wertvollen Ratschläge auch an dieser Stelle aufs herzlichste zu danken.

Einleitung.

Von den im Brauereibetriebe vorkommenden unerwünschten Sprosspilzen sind die zur Torula-Gruppe gehörenden die häufigsten. Vom Kühlschiff ab bis zum Lagerfass, ja über dieses hinaus, noch am Abfüllbock ist Gelegenheit zu einer Infektion des Bieres mit Torula-Arten in ausgiebiger Weise gegeben. Will spricht sich hierüber, wie über das Vorkommen dieser Organismen, in der Einführung zu seinen Untersuchungen über die Torrulaceen in folgender Weise aus:

„Sehr zahlreich sind die Sprosspilze, welchen wir im Brauereibetrieb an den verschiedensten Stellen begegnen. Wir werden kaum eine Würzeprobe vom Kühlschiff, von Leitungen, von Kühlapparaten usw. bei Betriebsrevisionen zur Beobachtung aufstellen können, ohne dass wir nicht mindestens in Spuren Vertreter der Gruppe Torula finden. Bei der biologischen Untersuchung von Brauwasser, bei Untersuchung der Luft in Brauereibetrieben, treffen wir diese Sprosspilze, man darf wohl sagen, regelmässig an. An den Aussenwandungen der Gärbottiche, am inneren Rand derselben, an den Wandungen der Lagerfässer, da, wo sich schwache weisse Ueberzüge gebildet haben, an den Spundlöchern der Lagerfässer, schier überall begegnen wir diesen Organismen. Sie gehören eben zu den am weitesten verbreiteten; sie siedeln sich auf organischen Substanzen an und entwickeln sich hier oft in geradezu kolossalen Mengen. Beispielsweise bestehen die dicken, weissen bis weissgelben mehligen Beläge auf Dauerwurstwaren oft ausschliesslich aus diesen Organismen. Bei der Verwesung mancher Pflanzenreste scheinen sie ebenfalls eine Rolle zu spielen etc.“[1])

Eine zusammenfassende Uebersicht über den derzeitigen Stand unserer Kenntnis der Torulaceen findet sich von Will in der speziellen Literatur niedergelegt.[2])

Die Torula-Arten sind einzellige, durch Sprossung sich vermehrende, nicht sporenbildende Organismen. Sie sind eingehend von Will in morphilogischer, physiologischer und biologischer Hinsicht studiert worden.[3])

---

1) H. Will, Beiträge zur Kenntnis der Sprosspilze ohne Sporenbildung etc. I. Mitteilung. Zeitschrift f. d. gesamte Brauwesen 1903, Jahrgang XXVI, S. 265.

2 und 3) II. Mitteilung in derselben Zeitschrift 1906, Jahrgang XXIX, S. 241, und im Centralblatt für Bakteriologie. II. Abt. 1903. Bd. X, S. 689; 1903, Bd. XVII, S. 1; und 1907, Bd. XVII, S. 3. III. Mitteilung.

Während früher zu den Torulaceen nur solche Sprosspilze gerechnet wurden, welche ausschliesslich mehr oder weniger kugelförmige und ovale Zellen, mit oder ohne Gärvermögen besitzen, hat Will auf Grund seiner Untersuchungen den Formenkreis weiter gezogen. Er umfasst unter dem Gattungsnamen Torula. als zweite Gruppe, auch solche Arten, welche neben kugelförmigen, den Zellen der ersten Gruppe gleichenden, noch andere, auch langgestreckte Zellformen besitzen. Diese verschiedenen Zellformen sprossen auseinander hervor. Die Arten dieser Gruppe, welche einige Aehnlichkeit mit den Mycoderma-Arten besitzen, unterscheiden sich von diesen durch die Fähigkeit alkoholische Gärung hervorzurufen. Die Monilien sind von der zweiten Gruppe der Torulaceen durch den Besitz eines Mycels mit Aussenwänden getrennt.

Zur Ergänzung dieser Arbeiten über Torulaceen hat Herr Prof. Will mir den grössten Teil der von ihm untersuchten Arten der ersten Gruppe zum weiteren Studium ihres chemisch-physiologischen Verhaltens überlassen.

Es sind folgende Nummern: 3, 4, 5, 6, 11 und 17. Die beigefügten Nummern beziehen sich auf die Nummer der Sammlung (des biolog. Lab. d. wiss. Stat. f. Brauerei i. M.). Torula 3 und 4 stammen aus der Luft in der Nähe eines Brauereibetriebes, in welchem sie sich in ungemein grosser Anzahl vorfanden; Torula 5 und 11 aus Kühlschiffwürze, Torula 6 aus der Luft eines Gärkellers, Torula 17 aus einem Brauwasser. [1])

Die mir gestellte Aufgabe war, das Verhalten der angeführten Arten gegenüber verschiedenen organischen Säuren, Aethylalkohol, verschiedene Zuckerarten, ihre Enzymerzeugung und Farbstoffbildung zu prüfen. Die Fragestellung und dieser entsprechend die Reihenfolge der Versuche war folgende:

1. Verhalten der Zuckerarten: Dextrose, Lävulose, Galaktose, Saccharose, Maltose und Milchzucker, welche von Will nach der Lindner'schen Kleingärmethode geprüft waren, gegenüber den Organismen, wenn der Gärversuch in grösserem Masstabe durchgeführt wird. Insbesondere ist bei Maltose und Milchzucker zu berücksichtigen ob Säure gebildet wird.

2. Durch welche Mengen von Aethylalkohol wird die Vermehrung der Organismen gehemmt?

3. Verhalten gegenüber den organischen Säuren. Essigsäure, Weinsäure, Milchsäure, Zitronensäure, Aepfelsäure und Bernstein-

1) H. Will. Beiträge zur Kenntnis der Sprossbildung ohne Sporenbildung etc. Centralblatt für Bakteriologie. Abt. II. 1907. Bd. XVII. S. 4.

säure. Welche Säuremengen wirken hemmend auf die Entwicklung der Organismen? Werden diese Säuren von den Organismen verzehrt? Wird aus den genannten Säuren Milchsäure gebildet?

4. Welche Enzyme, ausser dem schon nachgewiesenen eiweisslösenden, erzeugen die Organismen.

5. In welcher Weise wird die Bildung von Farbstoffen von Seite der Organismen durch die Belichtung beeinflusst?

Zu sämtlichen Versuchen kamen als Aussaatmaterial ausschliesslich Strichkulturen auf 10% gehopfter Würzegelatine zur Verwendung. Strichkulturen wurden Oberflächenkulturen in Petrischalen aus folgenden Gründen vorgezogen:

1. Die Strichkulturen sind viel leichter frei von einer sekundären Infektion zu halten.

2. Von den Strichkulturen, als Oberflächenkulturen, kann das Aussaatmaterial leicht in grössere Mengen frei von einer Beimengung des Nährbodens gewonnen werden, ein Vorteil, der für die meisten Versuche sehr wichtig ist.

3. Bei den Strichkulturen wird die Gelatine nicht so rasch verflüssigt, als bei den Kulturen in Petrischalen.

Als Nährflüssigkeit wurden verwendet:

1. Gehopfte Bierwürze von 14,2% B und zwar fast ausschliesslich zum Aufziehen der Organismen.

2. Hefewasser mit 6% Saccharose. [1])

3. Hefewasser ohne jeglichen Zusatz.

4. Peptonlösung von folgender Zusammensetzung:

0,5 g $CaH\ PO_4$
4,55 g $KH_2\ PO_4$
2,1 g $MgSO_4$
20,0 g Pepton-Witte
} auf 1 Ltr. destilliertes Wasser.

5. Dieselbe Peptonlösung mit 5% Saccharose.

6. Kossowicz-Nährlösung von folgender Zusammensetzung: [2])

5% Saccharose
0,4% KCl
0,4% $(NH_4)_2HPO_4$
0,4% $Mg\ SO_4$
0,04% $CaHPO_4$

1) Vorbereitet nach der Vorschrift von H. Will, Vergl. Hefewasser zur biologischen Analyse. Zeitschrift für das gesamte Brauwesen 1901. Bd. XXIV S. 290. Anmerkung.

2) Kossowicz, Alexander, Untersuchungen über das Verhalten der Hefen in mineralischen Nährlösungen. I. Mitteilung, Sonderabdruck aus der Zeitschrift f. d. landw. Versuchswesen in Oesterreich. 1903. S. 2.

Als feste Nährböden mit 10% Gelatine wurden verwendet:

1. Würzegelatine
2. Hefezuckergelatine
3. Peptonzuckerlösunggelatine
4. Kossowiczlösunggelatine.

Die Kulturen wurden vor jedem Versuche mehrmals in frische Würze übergeimpft und somit nur kräftiges, gut ernährtes Material zur Aussaat der Strichkulturen verwendet. Vor und nach jedem Versuche wurde noch auf evtl. Infektion mikroskopisch untersucht.

I.

Das Verhalten der Organismen gegenüber verschiedener Zuckerarten.

Das Verhalten der Organismen gegenüber verschiedener Zuckerarten wurde von H. Will schon früher nach der Kleingärmethode eingehend gepräft. [1])

Die Versuche wurden von mir nach derselben Methode wiederholt und noch einige andere Zuckerarten hinzugenommen.

Der Versuch wurde im Thermostaten bei 25 ° C. ausgeführt. Die Organismen wurden vor und nach dem Versuch mikroskopisch auf ihre Reinheit untersucht. Jedesmal wurden Pararell-Kulturen angelegt und Kontrollproben ohne Zuckerzusatz ausgeführt. Dauer des Versuches 4—5 Tage. Die geprüften Zuckerarten sind folgende: Dextrose, Lävulose, Galaktose, Saccharose, Maltose, Milchzucker, Raffinose und Arabinose. In der Tabelle bezeichnet das Pluszeichen eine Vergärung, das Minuszeichen keine Vergärung.

Die folgende Tabelle stimmt, soweit die gleichen Zuckerarten verwendet wurden, mit der von Will vollkommen überein.

Tabelle I.

No. der Torula-Arten.	Alter der Kulturen-Tage	Dextrose	Lävulose	Galaktose	Saccharose	Maltose	Milch-Zucker	Raffinose	Arabinose
3	21	+	+	+	+	—	—	+	
4	24	+	+	+	+	—	—	+	—
5	26	+	+	+	+	+	—	+	—
6	29	—	—	—	—	—	—	—	—
11	20	—	—	—	—	—	—	—	—
17	20	+	+	+	+	+	—	+	—

1) H. Will, Beiträge zur Kenntnis der Sprosspilze ohne Sporenbildung etc. III. Mitteilung, Zentralblatt für Bakteriologie. II. Abt. 1907. Bd. XVII, S. 610.

Ferner sollte die Kleingärmethode durch Versuche im grösseren Massstabe kontrollirt werden, da möglicherweise bei Anwendung der Kleingärmethode die schwervergärbaren Zuckerarten innerhalb der eingehaltenen Zeit eine merkbare alkoholische Gärung nicht eingehen konnten, die jedoch bei längerer Dauer eines im grösseren Massstabe durchgeführten Versuches nachzuweisen war.

Von den Zuckerarten wurden insbesondere Maltose und Milchzucker berücksichtigt, weil sie in den Gärungsgewerben die wichtigsten sind. Die Maltose wurde bei Anwendung der Kleingärmethode von den meisten Organismen nicht, der Milchzucker von allen nicht vergoren.

Es wurden also zur Kontrolle der Kleingärmethode folgende Zuckerarten untersucht: Dextrose, Lävulose, Galaktose, Saccharose, Maltose und Milchzucker. Der Versuch gestaltete sich folgendermassen: Absolut neutrales, mit Phenolphtaleïn als Indikator geprüftes Hefewasser erhielt einen Zusatz von je 6 % der angegebenen Zuckerarten. Die Zuckerlösungen wurden in Mengen von je 100 ccm auf 200 ccm Erlenmeyerkolben abgefüllt und mit je einer Platinöse des betreffenden Organismus geimpft. Das bei Zimmertemperatur herangezüchtete Einsaatmaterial war 19 Tage alt. Die Kulturen wurden in der Mitte des Zimmers aufgestellt.

Die Beobachtungen an diesen Kulturen sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

Tabelle I:

Beobachtungen über die äusseren Erscheinungen an den Kulturen.

Tabelle IIa:

Die Aciditätsbestimmung nach der Vergärung mit $^1/_2$ nNaOH und Phenolphtaleïn als Indikator.

Tabelle IIb:

Geruch der Flüssigkeit.

Tabelle III:

Refraktometrische Alkolbestimmung in Gw. % angezeigt. Das Pluszeichen bedeutet einen deutlichen Jodoformniederschlag, das Minuszeichen — nur den Jodoformgeruch.

Nach Abschluss des Versuches wurde die Reinheit der Kulturen mikroskopisch geprüft.

Tabelle I:

Beobachtungen über äussere Erscheinungen an den Kulturen.

No.	Zeitdauer	Dextrose	Lävulose	Galaktose	Saccharose	Maltose	Milchzucker
3	3 Tage	Starke Haut	Starke Haut	Starke Haut	Starke Haut	Starke Haut	Starke Haut
4	3 „	„ „	„ „	„ „	„ „	„ „	„ „
5	3 „	Ganz feine Haut	Ganz feine Haut	Ganz feine Haut	Ganz feine Haut	Ganz feine Haut	Ganz feine Haut
		—	—	—	Schaumbildung	—	—
6	3 „	Keine Haut	Keine Haut	Sehr feine Haut	Keine Haut	Keine Haut	Sehr feine Haut
11	3 „	Starke Haut	Starke Haut	Starke Haut	Starke Haut	Starke Haut	Starke Haut
17	3 „	„ „	„ „	„ — „	„ — „	„ — „	„ — „
5	5 „	Schaumbildung	Schaumbildung	—			—
6	5 „	Sehr feine Haut	Sehr feine Haut	—	Sehr feine Haut	Sehr feine Haut	—
5	6 „	—	—	Schaumbildung	—	—	—
4	7 „	—	Die obere Schicht der Flüssigkeit ist 0,5 cm breit intensiv grün gefärbt, die Grenze deutlich sichtbar.	—	—	—	—
5	7 „	—	—	—	—	Schaumbildung	—
5	8 „	—	—	—	Schaumrückgang	—	—
5	11 „	—	Schaumrückgang	Schaumrückgang	—	Schaumrückgang	—
4	17 „	—	—	Flüssigkeit grün gefärbt.	—	—	Flüssigkeit grün gefärbt
5	17 „	Schaumrückgang	—	—	—	—	—
3	18 „	Flüssigkeit grün gefärbt	—	Flüssigkeit grün gefärbt.	Flüssigkeit grün gef.	—	—
4	18 „	—	—	—			
4	20 „	Flüssigkeit grün gef.	—	—	„ — „ „	—	—
						—	—

(Fortsetzung der Tabelle I Seite 13).

Tabelle I: (Fortsetzung).

Beobachtungen über äussere Erscheinungen an den Kulturen.

No.	Zeitdauer	Dextrose	Lävulose	Galaktose	Saccharose	Maltose	Milchzucker
3	52 Tage	Flüssigk. grün-gelb gefärbt. Starker Bodensatz. Rand zitronengelb gef.	Flüssigkeit braun-gelb, fluoresciert. Starker Bodensatz Rand zitron.-gelb gefärbt.	Flüssigkeit intensiv grün gefärbt, fluoresciert. Starker Bodensatz. Rand zitronengelb gef.	Flüssigkeit intensiv grün gefärbt, fluoresciert. Starker Bodensatz. Rand zitronengelb gef.	Die ursprüngliche braune Farbe stark abgeschwächt, die Flüssigkeit braun-gelb gefärbt, fluoresc. Starker Bod.-satz.	D. Flüssigk. schwach rosa gefärbt. Stark. Bodensatz. Rand zitronengelb gef.
4	52 „	Wie Torula 3	Wie Torula 3.	Wie Torula 3	Wie Torula 3	Wie Torula 3	Wie Torula 3
5	52 „	Nur der Ring rosa gefärbt. Starker, schleimig. Bodensatz. Flüssigkeit fadenziehend.	Starker, schleimiger Bodens. Flüssigkeit fadenziehend. Keine Farbstoffbildung.	Wie bei Lävulose	Wie bei Dextrose	Flüssigkeit rosa gefärbt und fadenziehend. Bodensatz zu einem Schleimklumpen zusammengeballt.	Wie bei Lävulose
6	52 „	Flüssigkeit schwach grün-gelb gefärbt. Mäss. Bodensatz.	Keine Farbstoffbildung. Mässiger Bodensatz.	Wie bei Lävulose	Wie bei Dextrose	Flüssigkeit schwach rosa gefärbt. Mäss. Bodensatz	Wie bei Maltose
11	52 „	Flüssigk. grün-gelb gefärbt. Starker Bodensatz. Rand zitron.-gelb gef.	Wie bei Dextrose. Starker Bodensatz	Flüssigkeit schwach grüngelb gefärbt. Starker Bodensatz	Wie bei Dextrose	Keine Farbstoffbildung. Stark. Bod.-satz.	Flüssigkeit schwach grüngelb gefärbt. Starker Bodensatz
17	52 „	Wie bei Torula 11.	Wie bei Torula 11.	Wie bei Torula 11.	Wie bei Torula 11.	Wie bei Torula 11.	Wie bei Torula 11.

Es zeigt sich, dass die Organismen beinahe gleich gut bei Gegenwart aller Zuckerarten wachsen, dass sie also auch solche Kohlenhydrate zu assimilieren vermögen, welche sie nicht in Alkohol und Kohlensäure spalten. Die Wachstumserscheinungen waren die gleichen, welche auf Hefewasser mit 6% Rohrzucker und anderen Nährflüssigkeiten von H. Will beobachtet wurden.[1])

Aeusserlich sichtbare Gärungserscheinungen traten nur bei Torula 5 und zwar in Dextrose, Lävulose, Galaktose, Maltose und Saccharose auf; am stärksten in Saccharose. In allen mit Torula 5 beimpften Zuckerlösungen, aber hauptsächlich in der Maltoselösung, ist eine starke Verschleimung des Bodensatzes eingetreten,[2]) was sich bei der Destillation sehr unangenehm bemerkbar machte.

Die Beobachtungen über Fluorescenz und insbesondere über Farbstoffbildung werden im letzten Abschnitt noch zur Sprache kommen; die Beobachtungen Wills fanden durch diese im allgemeinen ihre Bestätigung.

Hier soll nun ein interessanter Fall, der sehr selten zu beobachten ist, erwähnt werden. Es war nämlich bei diesem Versuche sehr deutlich zu bemerken, wie der Farbstoff von den Organismen erzeugt wurde, und in die Flüssigkeit allmählich hineindiffundirte. Nach 7 Tagen war bei Torula 4 eine 0,5 cm breite, intensiv grün gefärbte und nach der ungefärbten scharf begrenzte Flüssigkeitsschichte zu sehen. Täglich hatte sich die Schicht von oben nach unten verbreitert bis schliesslich die ganze Flüssigkeit gleichmässig gefärbt erschien.

Tabelle IIa.

Die Aciditätsbestimmung nach der Gärung mit $^1/_2$ n. Natronlauge und Phenolphtalein als Indikator.

No. der Art	Dextrose	Lävulose	Galaktose	Saccharose	Maltose	Milchzucker
	ccm $^1/_2$ NaOH	ccm $^1/_2$ NaOH	ccm $^1/_2$ NaOH	ccm $^1/_2$ NaOH	ccm $^1/_2$ NaOH	ccm $^1/_2$ NaOH
3	0,3	0,35	0,4	0,5	0,25	0,2
4	0,15	0,3	0,25	0,3	0,25	0,2
5	0,2	1 Tropfen	0,15	0,2	2 Tropfen	1 Tropfen
6	2 Tropfen	0,2	0,25	0,4	0,25	0,2
11	0,35	0,25	0,25	0,4	0,5	1 Tropfen
17	0,25	0,15	0,15	0,25	0,15	0,2

1) H. Will, Beiträge zur Kenntnis der Sprosspilze etc. III. Mitteilung Zentralblatt f. Bakt. II. Abt. 1907. Bd. XVII, S. 86.

2) Ebenda. S. 188.

Tabelle IIb.

Geruch der Flüssigkeiten.

No.	Dextrose	Lävulose	Galaktose	Saccharose	Maltose	Milchzucker
3	angenehmer obstähnlicher Geruch	angenehmer obstähnlicher Geruch	Käsegeruch	angenehmer obstähnlicher Geruch	angenehmer obstähnlicher Geruch	Geruchlos
4	„	„	Geruch nach ranziger Butter	„	„	angenehmer obstähnlicher Geruch
5	„	Geruchlos	angenehmer obstähnlicher Geruch	„	„	Geruchlos
6	„	„	Geruchlos	Geruchlos	Geruchlos	„
11	„	angenehmer obstähnlicher Geruch	Geruch nach ranziger Butter	angenehmer obstähnlicher Geruch	angenehmer obstähnlicher Geruch	Geruch nach ranziger Butter
17	„	„	angenehmer obstähnlicher Geruch	„	„	„

Nach zwei Monaten wurde der Versuch abgebrochen, bei den meisten Organismen mit verschiedenen Zuckerarten war beim Oeffnen der Kolben ein angenehmer, obstähnlicher Geruch wahrzunehmen, was auch von H. Will beobachtet wurde[1]); bemerkenswert ist der Geruch nach ranziger Butter oder nach Käse bei einigen dieser Organismen. (No. 3, 4, 11 u. 17.)

Die Säurebestimmung wurde in 10 ccm der Flüssigkeit mit $^1/_2$ n. Natronlauge ausgeführt. Da es sich hier um Bestimmung schwacher, organischer Säuren handelt, so wurde als Indikator Phenolphtaleïn gewählt.

Der Uebergang der neutralen Reaktion der Nährlösung in die saure beweist, dass während der Vergärung der verschiedenen Zuckerarten gleichzeitig eine Säurebildung vor sich geht. Die Säure entsteht nicht durch eine etwaige Oxydation des gebildeten Aethylalkohols, sondern bei dem Gärungsprozess selbstständig, parallell mit der Alkoholbildung; die Säurebildung geht also in irgend welcher Weise neben dem Abbau der Zuckerarten her. Diese Vermutung findet eine Bestätigung in einem späteren Versuche, der die Feststellung der Alkoholmengen, welche die Organismen noch zu ertragen vermögen, zum Gegenstand hatte. Nach Abschluss dieses Versuches wurde, obgleich er beinahe dieselbe Zeit dauerte u. die Organismen sich sehr gut entwickelt

1) H Will, Beiträge zur Kenntnis der Sprosspilze etc. III. Mitteilung, Zentralblatt f. Bakt. Abt. II. 1907, Bd. XVII, S. 90 und I. Mittlg., Zeitschrift f. d. ges. Brauwesen 1903, Jahrgang XXVI. S. 282.

hatten, keine Säurebildung bemerkt; ja bei gewissen Alkoholmengen gediehen manche viel besser, als ohne Alkoholzusatz; es war der Alkohol offenbar als Nährstoff benützt worden, was auch die ermittelte Alkoholabnahme beweist.

Für die Saccharomyceten ist die Bildung von flüchtigen (Ameisen-, Essig- und anderer Fettsäuren) und nicht flüchtigen (Bernstein-, Oxal, und Milchsäure) Säuren als Nebenprodukte bei der Alkoholgärung als erwiesen zu betrachten.[1]) Die von Müller-Thurgau untersuchten Apiculatus-Arten erzeugten bei der Gärung beträchtliche Mengen an flüchtigen und fixen Säuren.[2]) Auch die von Meissner untersuchte Rahmhefen, in Zuckerlösungen gewachsen, erzeugten verschiedene Säuren, wobei der gebildete Alkohol direkt zu Wasser und Kohlensäure verbrannt wurde.[3])

Die Säurezahlen in der Tabelle sind Mittelzahlen von zwei Parallelkulturen

Tabelle III.

Alkoholbestimmung mit dem Eintauch-Refraktometer von Zeiss.

No.	Dextrose	Lävulose	Galaktose	Saccharose	Maltose	Milchzucker
	g. % Alkohol	g. % Alkohol	g. % Alkohol	g. % Alkohol	g. % Alkohol	g. % Alkohol
3	0,42 +	0,21 +	0,14 +	0,63 +	0,18 —	0,0 —
4	0,49 +	0,42 +	0,21 +	0,60 +	0,07 —	0,0 —
5	1,93 +	1,61 +	1,68 +	2,0 +	1,52 +	0,21 —
6	0,14 +	0,32 +	0,07 +	0,28 +	0,07 +	0,21 +
11	0,49 +	0,07 +	0,07 +	0,49 +	0,21 —	0,32 —
17	1,04 +	0,63 +	0,49 +	1,29 +	0,21 +	0,28 +

Die quantitative Alkoholbestimmung wurde folgendermassen ausgeführt. Der Kolbeninhalt wurde samt der entwickelten Vegetation in einen Destillationskolben umgefüllt und mit 25 ccm destilliertem Wasser nachgespült, so dass die Gesamtmenge der Flüssigkeit 125 ccm betrug. Von diesen wurden 100 ccm abdestilliert und im Destillat der Alkohol refraktometrisch bestimmt, so dass die Refraktometeranzeige dem gesuchten Gehalt an Aethylalkohol entsprach. In allen Fällen hatte das Destillat, mit Lackmuspapier geprüft, eine neutrale Reaktion.

Qualitativ wurde die Anwesenheit von Alkohol mittels der Jodoformreaktion nachgewiesen. Ein Teil des Destillates wurde nach gelindem Erwärmen im Reagenzrohr mit 5—6 Tropfen

1) Technische Mykologie von Franz Lafar 1907, Bd. II, S. 803—815.

2) Meissner, die Mykoderma. Handbuch d. techn. Mykologie von Franz Lafar 1907, Bd. IV, S. 312.

3) Müller-Thurgau, Saccharomyces apiculatus. Ebenda. S. S. 319, 326.

10%iger Kalilauge und hierauf solange mit einer Jodlösung versetzt, (1 Tl. Jod, 1 Tl. Jodkalium, 10 Tl. Wasser) bis sich die Flüssigkeit schwach braun gefärbt hatte. Durch Zusatz von einem Tropfen Kalilauge wurde die braune Farbe zum Verschwinden gebracht. Um volle Gewissheit über die Jodoformreaktion zu erhalten, wurde sie wiederholt ausgeführt und zu diesem Zweck wurde das erste Destillat wieder in den Destillationskolben zurückgegeben. Von dem zweiten fing man nur die ersten 15 - 20 ccm auf, um ein konzentrierteres Destillat zu erhalten. Die Reaktionen stimmten in den beiden Destillaten überein. Jodoformgeruch gaben zwar alle Proben; als Beweis für die Anwesenheit von Aethylalkohol galt aber nur ein deutlicher gelber Niederschlag, welcher nach der mikroskopischen Untersuchung aus hexagonalen Täfelchen und Sternen bestand. Der Milchzucker würde demnach von Torula 6 und 17 im Gegensatz zu den Ergebnissen der Kleingärmethode vergoren worden sein. Gleichwohl wäre noch zu untersuchen, ob nicht die Jodoform-Reaktion in anderer Weise zustande kommen konnte. So wäre die Gegenwart einer Milchsäure [1]) zu berücksichtigen, welche durch Einwirkung von Alkali auf Milchzucker entstanden sein konnte, [2]) in dem Falle, dass das Hefewasser alkalisch reagierte. Ausserdem könnte bei saurer Reaktion des Hefewassers beim Kochen der Milchsäure Lävulinsäure entstehen, welche eine Ketongruppe enthält und die Jodoformreaktion geben könnte. [3])

Da jedoch das Hefewasser nach seinem Verhalten gegenüber Lackmus und Phenolphtalein als neutral zu betrachten war, auch das geprüfte Destillat neutral reagierte, so fallen diese Einwände fort Der Jodoformniederschlag konnte also nur durch dessen Gehalt an Aethylalkohol bedingt sein.

In den Tabellen stimmen in etlichen Fällen die Refraktometeranzeige mit der Jodoformreaktion nicht überein. Wahrscheinlich hatten sich flüchtige Ester gebildet, welche nicht ohne einen Einfluss auf die Refraktometeranzeige waren; eine Bestätigung findet diese Annahme durch den wahrgenommenen obstähnlichen Geruch.

Vergleicht man die Ergebnisse der Kleingärmethode mit denjenigen der Gärversuche im Grossen, so fällt sofort die völlige Verschiedenheit zwischen beiden bei Torula 6 und 11 auf. Die nach der Kleingärmethode durchgeführten Versuche haben in

1) Beilstein, Handbuch der anorganischen Chemie, Band I, S. 224.

2) Beilstein, Handbuch der organischen Chemie. Bd. 1, S. 1062.

3) Ebenda. S. S. 598—599 und 1063, Vortmann, Anleitung z. chem. Analyse S. 110.

Uebereinstimmung mit denjenigen von Will für alle geprüften Zuckerarten eine alkoholische Gärung nicht erkennen lassen, dagegen bei den Versuchen im grösseren Masstabe, haben die zwei der genannten Torula-Arten mit allen Zuckerarten und zwar auch mit Milchzucker eine solche veranlasst. Die Hauptursache der Verschiedenheit der Ergebnisse ist in der geringen Gärungsenergie der Organismen und in der kurzen Dauer des Versuchs zu suchen.

Der Kleingärmethode von P. Lindner kommt also nur der Wert eines orientierenden Versuches zu.

II.

Hemmung der Entwicklung durch Aethylalkohol.

Diese Versuchsreihe bezweckte, diejenige Menge von Aethylalkohol festzustellen, welche in verschiedenen Nährflüssigkeiten die Vermehrung der eingeimpften Torula-Arten zu hemmen im Stande ist.

Die angewandten Nährflüssigkeiten waren folgende:

1. Hefewasser,
2. Peptonlösung,
3. Reinhefebier mit einem Extraktgehalt von 4,8 % und 4 Vol.-Proz. Alkohol.

Das Reinhefebier wurde aus einem der Reinzuchtapparate der wissenschaftlichen Station für Brauerei in München unter Beobachtung aller Vorsichtsmassregeln entnommen. Es blieb vor Anstellen des Versuches zwei Wochen in einem 1 Ltr.-Pasteurkolben stehen, um erstens sicher zu sein, dass beim Abziehen und beim Transport keine Infektion stattgefunden hatte und zweitens, damit sich die Hefe möglichst vollständig absetzen konnte.

Das klare Bier wurde in Mengen von je 10 ccm in Freudenreich-Kölbchen von 30 ccm Inhalt, welche im Heissluftsterilisator bei 140—150° C vorbereitet waren, folgendermassen abgefüllt:

Der Pasteurkolben mit dem Reinhefebier wurde durch einen mit 96%igem Alkohol gut ausgewaschenen Gummischlauch mit einer ebenso zubereiten Ueberlaufbürette mit automatischer Nullpunkteinstellung verbunden, bei welcher die eine Oeffnung des oberen Kugelansatzes mit einer Gummikappe verschlossen, die andere mit steriler Watte zugestopft war. Durch Neigen des hochangebrachten Pasteurkolbens wurde die Bürette gefüllt und zunächst dreimal mit dem Reinhefebier zur Entfernung des noch

anhaftenden Alkohols ausgespültt. Das Füllen und der Zusatz der erforderlichen Alkoholmengen geschah möglichst rasch, um eine Infektion zu vermeiden. Ausserdem blieben aber die gefüllten Kölbchen zwei Wochen bei 25° C vor der Impfung stehen; es hatte sich indessen doch noch Hefe am Boden abgesetzt, aber in ganz minimalen Mengen, welche nach H. Will [1]) bei reichlichem Zutritt von Luft die Torula-Arten nicht wesentlich beeinträchtigen.

Das Hefewasser und die Peptonlösung wurden in der gleichen Menge wie das Reinhefebier in der gewöhnlichen Weise in Freudenreich-Kölbchen abgefüllt und diese $^1/_4$ Stunde im strömenden Dampf sterilisiert. Später erhielten die Nährflüssigkeiten den entsprechenden Zusatz von Alkohol.

Das Impfmaterial wurde aus 20 Tage alten bei Zimmertemperatur (17—18° C) gewachsenen Strichkulturen entnommen und in steriler Würze verteilt. Jedes Freudenreich-Kölbchen erhielt eine Platinöse dieser Würze mit dem betreffenden Organismus. Die Kulturen wurden in Termostaten bei 25° C. aufgestellt. Die Beobachtungen sind übersichtlich in den folgenden Tabellen zusammengefasst. Zum Verständnis der in den Tabellen gebrauchten Bezeichnungen für die Art und Weise des Wachstums, welches in den Kulturen in die Erscheinung trat, sei bemerkt, dass mit „Ringbildung" ein stärkeres Wachstum längs des Flüssigkeitsrandes bezeichnet ist. Wenn sich die Organismen noch weit über den Flüssigkeitsrand auf der Wandung des Kulturgefässes ausbreiteten, ist die Bezeichnung „Randbildung" gewählt. Wenn man die (Tabellen I, II und III) Grenzwerte für die Entwicklungsfähigkeit der Organismen in den drei Nährflüssigkeiten vergleicht, so fällt es auf, dass diese Werte bei dem Hefewasser und der Peptonlösung völlig übereinstimmen, bei dem Reinhefebier dagegen viel höher liegen.

Grenzwerte für die Entwicklungsfähigkeit:

	Peptonlösung	Hefewasser	Reinhefebier
Torula 3	4% Alkohol	4% Alkohol	8% Alkohol
„ 4	4% „	4% „	8% „
„ 5	5% „	5% „	9% „
„ 6	6% „	6% „	8% „
„ 11	4% „	4% „	8% „
„ 17	6% „	6% „	8% „

1) Zeitschrift für das ges. Brauwesen 1903. Jahrgang XXVI. S. 301.

Tabelle I, Hefewasser.

Torula No.	Nach Tagen	Blinder Versuch	1%	2%	3%	4%	5%	6%	7-10%
3	1 Tage	Hautbildung	Hautbildung	Hautbildung	Hautbildung	—	—	—	—
	2 „		Hautbildung und Bodensatz gleich d. blinden Versuch.	Das Wachstum gegenüber d. blinden Versuch zurückgeblieben.	Das Wachstum gegenüber d. blinden Versuch sehr stark zurückgeblieben	—	—	—	—
	7 „			Hautentwicklung u. Bodensatzmenge gleich dem blinden Versuch.	Haut u. Bodensatz holen den blinden Versuch ein	—	—	—	—
	8 „	Mässiger Bodensatz schwache Randbildung, keine Farbstoffbildung.	Haut und Bodensatz viel stärker, die Randbildung viel höher, als beim Kontrollversuch. Flüssigkeit gelbgrün gefärbt.	Wie bei 1%	Wie bei 1%	Hautbildung	—	—	—
	28 „		Die Flüssigkeit intensiv gelb-grün gefärbt.	Wie bei 1%	Wie bei 1%	Haut und Bodensatz viel stärker als beim blinden Versuch. Die Flüssigkeit gelb-grün gef.	—	—	—
	35 „					Die Randbildung viel höher als beim Kontrollversuch	—	—	—
	45 „					Die Flüssigkeit intensiv gelb-grün gefärbt	—	—	—
	80 „	Keine Farbstoffbildung. Ziemlich starker Bodensatz.	Das Wachstum ein viel üppigeres als beim blinden Versuch.	Wie bei 1%	Wie bei 1%	Wie bei 1%	—	—	—

Tabelle I, Hefewasser. (Fortsetzung).

Torula No.	Nach Tagen	Blinder Versuch	1%	2%	3%	4%	5%	6%	7—10%
4	1 Tag	Hautbildung	Hautbildung	Hautbildung	Hautbildung	—	—	—	—
	2 „		Wie bei Torula 3	Wie bei Torula 3	Wie bei Torula 3	—	—	—	—
	7 „			Wie bei Torula 3	Wie bei Torula 3	Hautbildung	—	—	—
	8 „	Wie bei Torula 3	Wie bei Torula 3 nur keine Farbstoffbildung	Wie bei Torula 3 nur keine Farbstoffbildung.	Wie bei Torula 3 nur keine Farbstoffbildung		—	—	—
	28 „					Wie bei Torula 3 nur keine Farbstoffbildung	—	—	—
	35 „		Die Flüssigkeit deutlich gelbgrün gefärbt	Wie bei 1%	Die Flüssigkeit schwach gelbgrün gefärbt	Wie bei 3%	—	—	—
	45 „					Die Randbildung viel höher als beim Kontrollversuch	—	—	—
	80 „		Wie bei Torula 3	Wie bei Torula 3	Wie bei Torula 3	Wie bei Torula 3	—	—	—

Tabelle I, Hefewasser. (Fortsetzung).

Torula No.	Nach Tagen	Blinder Versuch	1%	2%	3%	4%	5%	6%	7—10 %
5	1 Tag	—	—	—	—	—	—	—	—
	2 „	—	—	—	—	—	—	—	—
	7 „	Feine Haut	Eine sehr starke Haut gegenüber der dünnen beim blind. Versuch. Hohe Randbildg.	Wie bei 1%	Wie bei 1%	Die Haut schwächer als bei 3%, aber stärker als beim Kontrollversuch	—	—	—
	8 „					Die Randbildung viel höher als beim blinden Versuch	Schwache Vermehrung	—	—
	28 „						Der Bodensatz nicht schwächer als beim blinden Versuch		
	35 „						Haut, Bodensatz und Randbildg. viel stärker als beim blinden Versuch	—	—
	45 „							—	—
	80 „	Ziemlich starker Bodens. keine Farbstoffbildg.	Haut und Bodensatz viel stärker, der Rand viel höher als beim blind. Versuch. keine Farbstoffbildung	Wie bei 1%	Wie bei 1%	Wie bei 1%	Wie bei 1%	—	—

Tabelle I, Hefewasser. (Fortsetzung).

Torula No.	Nach Tagen	Blinder Versuch	1%	2%	3%	4%	5%	6%	7—10%
6	1 Tag	—	—	—	—	—	—	—	—
	2 „	—	—	—	—	—	—	—	—
	7 „	Schwache Haut	Bei gleich. Hautbildg. d. Bodensatz stärker als beim blinden Versuch	Wie bei 1%	Haut und Bodensatz schwächer als beim blinden Versuch	Haut u. Bodens. viel schwächer als beim blinden Versuch	—	—	—
	8 „				Bodensatz stärker als beim blinden Versuch		—	—	—
	28 „	Sehr mässiger Bodensatz	Haut und Bodensatz viel stärker als b. Kontrollvers. Schwache gelb-grüne Färbung	Wie bei 1%	Wie bei 1%	Wie bei 1%	Wie bei 1%	Deutliche Vermehrung	—
	35 „	Keine Randbildg.	Randbildung	Wie bei 1%	Wie bei 1%	Wie bei 1%	Schwache Randbildung	Hautbildung	—
	45 „								—
	80 „	Mässiger Bodensatz, keine Farbstoffbildung	Starker Bodensatz. Die Flüssigkeit intensiv gelb-grün gefärbt = 2% Torula 3	Wie bei 1% nur die Färbung etwas schwächer	Wie bei 1% deutliche Farbstoffbildung	Wie bei 1% deutliche Farbstoffbildung	Wie bei 1%, schwache Färbg.	Randbildung, Bodensatz stärker als beim blinden Versuch, keine Farbstoffbildg.	—

Tabelle I, Hefewasser. (Fortsetzung).

Torula No.	Nach Tagen	Blinder Versuch	1%	2%	3%	4%	5%	6%	7—10%
11	1 Tag	—	—	—	—	—	—	—	—
	2 „	—	—	—	—	—	—	—	—
	7 „	Hautbildung	Haut viel stärker als beim blind. Versuche	Wie 1%	Ziemlich starke Vermehrung	—	—	—	—
	8 „		Randbildg. höher als b. Kontrollversuche	Wie 1%	Wie 1%	Haut stärker, Randb. höher als b. Kontrollvers.	—	—	—
	28 „	Ziemlich starker Bodensatz	Haut u. Bodens. stärker, Randbildung höher als beim blind. Versuche	Wie 1%	Wie 1%	Wie 1%	—	—	—
	35 „		Deutl. gelb-grüne Färbung der Flüssigkeit	Wie 1%	Wie 1%	Wie 1%	—	—	—
	45 „						—	—	—
	80 „	Keine Farbstoffbildung	Intensiv gelbgrüne Färbung, etwas schwäch. als bei Torula 3	Wie 1%	Wie 1%	Wie 1%	—	—	—

Tabelle I, Hefewasser. (Fortsetzung).

Torula No.	Nach Tagen	Blinder Versuch	1%	2%	3%	4%	5%	6%	7—10 %
17	1 Tag	—	—	—	—	—	—	—	—
	2 „	—	—	—	—	—	—	—	—
	7 „	Hautbildung	Haut viel stärker als beim blinden Versuch	Wie 1%	Wie 1%	Wie 1%	Schwache Vermehrung	—	—
	8 „		Randbildg. höher als beim blinden Versuche	Wie 1%	Wie 1%	Wie 1%	Wie 1%	—	—
	28 „		Haut u. Bodens. stärker, Randbildg. höher als b. blinden Vers.	Wie 1%	Wie 1%	Wie 1%		—	—
	35 „							Starke Vermehrg	—
	45 „							Haut u. Bodens. stärker, Randbildg. höher als b. blind. Vers.	—
	80 „	Ziemlich starker Bodens., keine Farbstoffbildg.	Schwach gelb-gr. Färbung	Wie 1%	Wie 1%	Wie 1%	Keine Farbstoffbildung	Wie 5%	—

Tabelle II, Peptonlösung.

Torula No.	Nach Tagen	Blinder Versuch	3%	4%	5%	6%	7—10%
3	6	Hautbildung	—	—	—	—	—
	9		Hautbildung	—	—	—	—
	11			Hautbildung	—	—	—
	19				—	—	—
	30		Die Flüssigkeit intensiv gelb-grün gefärbt	Wie 3% nur schwächer	—	—	—
	36	Starker Bodensatz	Starker Bodensatz	Mässiger Bodensatz	—	—	—
	60	Keine Rand- und Ringbildung. Starker Bodensatz	Wie beim blinden Versuche	Wie beim blinden Versuche	—	—	—
4	6	Hautbildung	—	—	—	—	—
	9		—	—	—	—	—
	11		Hautbildung	—	—	—	—
	19			Hautbildung	—	—	—
	30		Die Flüssigkeit intensiv gelb-grün gefärbt, intensiver als Torula 3	Wie 3%	—	—	—
	36	Starker Bodensatz	Wie beim Kontrollversuch	Mässiger Bodensatz	—	—	—
	60	Wie bei Torula 3	Wie bei Torula 3	Wie bei Torula 3	—	—	—

Tabelle II, Peptonlösung. (Fortsetzung.)

Torula No.	Nach Tagen	Blinder Versuch	3%	4%	5%	6%	7—10%
5	6	Hautbildung	Hautbildung	—	—	—	—
	9			Feine Hautbildung	—	—	—
	11				—	—	—
	19				Sehr feine Haut	—	—
	30					—	—
	36	Schwache Randbildung.	Wie beim Kontrollversuch	Wie beim Kontrollversuch	Wie beim Kontrollversuch	—	—
	60	Starker Bodensatz Schwache Ringbildung. Keine Farbstoffbildung	Wie beim blinden Versuche	Mässiger Bodensatz, sonst wie beim blinden Versuche	Wie 4%	—	—
6	6	—	—	—	—	—	—
	9	Hautbildung	—	—	—	—	—
	11		—	—	—	—	—
	19		—	—	—	—	—
	30		Keine Hautbildung, deutliche Vermehrung als Bodensatz	Wie 3%	—	—	—
	36		Sehr dünne Haut, welche beim Schütteln zu Boden fällt	Wie 3%	Wie 3%	Wie 3%	—
	60	Ziemlich starker Bodensatz, keine Rand- und Ringbildung, auch keine Farbstoffbildung	Wie beim blinden Versuche	Mässiger Bodensatz, sonst wie beim blinden Versuche	Wie 4%	Schwacher Bodensatz, sonst wie beim blinden Versuche	—

Tabelle II, Peptonlösung. (Fortsetzung.)

Torula No.	Nach Tagen	Blinder Versuch	3%	4%	5%	6%	7—10%
11	6	Hautbildung	—	—	—	—	—
	9		—	—	—	—	—
	11		Hautbildung	—	—	—	—
	19			Hautbildung	—	—	—
	30	Randbildung	Wie beim Kontroll-versuch	Wie beim Kontroll-versuch	—	—	—
	36	Starke Ringbildung	Starke Ringbildung und die Flüssigkeit hat sich gelb-grün gefärbt	Wie 3%	—	—	—
	60	Starker Bodensatz Keine Farbstoff-bildung	Der Bodensatz kaum stärker als beim blinden Versuche	Wie 3%	—	—	—
17	6	Hautbildung	—	—	—	—	—
	9		Hautbildung	—	—	—	—
	11			Hautbildung	—	—	—
	19				—	—	—
	30	Starke Haut- und Randbildung	Wie beim blinden Versuche	Wie beim blinden Versuche	Hautbildung Wie beim blinden Versuche	Hautbildung Wie beim blinden Versuche	—
	36	Starke Ringbildung	Starke Ringbildung	Wie 3%	Wie 3%	Wie 3%	—
	60	Starker Bodensatz Keine Farbstoff-bildung	Der Bodensatz nicht stärker als beim blinden Versuche, keine Farbstoff-bildung	Wie 3%	Wie 3%	Wie 3%	—

Tabelle III, Reinhefebier.

Torula No.	Nach Tagen	Reinhefebier mit 4% Alkoholgehalt	5%	6%	7%	8%	9%	10—12 %
3	14	Hautbildung	—	—	—	—	—	—
	19		Schwache Hautbildung	Wie 5%	—	—	—	—
	24				Schwache Hautbildung	—	—	—
	30	Schwache Randbildung	Wie 4%	Wie 4%	Wie 4%	—	—	—
	36	Schwache Ringbildung	Wie 4%	Wie 4%	Wie 4%	—	—	—
	60	Mässiger Bodensatz	Schwacher Bodensatz	Wie 5%	Wie 5%	Sehr schwache Ringbildung, keine Haut	—	—
4	14	Hautbildung	—	—	—	—	—	—
	19		Schwache Hautbildung	—	—	—	—	—
	24			Schwache Hautbildung	Wie 6%	—	—	—
	30	Schwache Randbildung	Wie 4%	Wie 4%	Wie 4%	—	—	—
	36	Schwache Ringbildung	Wie 4%	Wie 4%	Wie 4%	—	—	—
	60	Mässiger Bodensatz	Schwacher Bodensatz	Wie 5%	Wie 5%	Vermehrung nur im Bodensatz	—	—
5	14	Hautbildung	—	—	—	—	—	—
	19	Starke Hautbildung	Schwache Hautbildung	Wie 5%	—	—	—	—
	24				Hautbildung	—	—	—
	30	Starke Ringbildung	Schwache Ringbildung			—	—	—
	36	Mässiger Bodensatz	Schwacher Bodensatz	Wie 5%	Wie 5%	—	—	—
	60					Vermehrung im Bodensatz (Ob durch Torula 5?)	Wie 8%	—

Tabelle III, Reinhefebier. (Fortsetzung)

Torula No.	Nach Tagen	Reinhefebier mit 4% Alkoholgehalt	5%	6%	7%	8%	9%	10—12 %
6	14	Sehr schwache Haut	—	—	—	—	—	—
	19		Sehr feine Haut	—	—	—	—	—
	24			Sehr feine Haut	Wie 6%	—	—	—
	30	Schwache Ringbildung	Wie 4%	Wie 4%		—	—	—
	36				Schwache Ringbildung	—	—	—
	60	Sehr mässiger Bodensatz	Schwacher Bodensatz	Wie 5%	Wie 5%	Vermehrung im Bodensatz und Ringbildung	—	—
11	14	Feine Haut	—	—	—	—	—	—
	19		Feine Haut	—	—	—	—	—
	24			Feine Haut	—	—	—	—
	30				Feine Haut	—	—	—
	36	Schwache Ringbildung	Wie 4%	Wie 4%	Wie 4%	—	—	—
	60	Starker Bodensatz	Mässiger Bodensatz	Schwacher Bodensatz	Wie 6%	Keine Haut, schwache Ringbildung	—	—
17	14	Hautbildung	—	—	—	—	—	—
	19		Hautbildung	Hautbildung	—	—	—	—
	24				Hautbildung	—	—	—
	30					Hautbildung	—	—
	36	Schwache Ringbildung	Wie 4%	Wie 4%	Wie 4%	Wie 4%	—	—
	60	Starker Bodensatz	Zieml. stark. Bodensatz	Zieml. stark. Bodensatz	Schwacher Bodensatz	Wie 7%	—	—

Bei Torula 3, 4, 5 und 11 steigen die Grenzwerte um 4%, bei Torula 6 und 17 um 2%. Ferner ist noch auffällig, dass Torula 6 und 17, welche im Hefewasser und Peptonlösung den höchsten Alkoholgehalt vertragen können, im Reinhefebier nicht ebenfalls einen höheren Grenzwert als die übrigen Organismen aufweisen, vielmehr den gleichen wie alle übrigen. Ja er liegt sogar scheinbar noch um 1% niedriger als bei Torula 5, bei welcher der Grenzwert in der Peptonlösung und im Hefewasser um 1% hinter denjenigen von Torula 6 und 17 in den gleichen Nährlösungen zurückbleibt. Wahrscheinlich liegt jedoch der Grenzwert für Torula 5 nicht höher als bei den übrigen, denn das Reinhefebier setzt immer noch Hefe ab und es ist ohne mikroskopische Untersuchung nach den äusseren Erscheinungen allein, welche in Bodensatzbildung bestand, nicht zu beurteilen, ob eine Vermehrung der eingeimpften Torula stattgefunden hatte. Bei der mikroskopischen Untersuchung ist es aber auch recht schwierig ein klares Bild von dem gegenseitigen Mengenverhältnis zwischen Hefe und Torula zu bekommen und aus diesem auf eine Vermehrung der Einsaat zu schliessen.

Eine Möglichkeit, zu einem klaren Bild zu gelangen, wäre gegeben, wenn die beigemengte Bierhefe zur Sporenbildung gebracht und damit von der eingeimpften Torula unterschieden werden könnte. Das ist jedoch unmöglich. Erstens entwickeln die Kulturhefen im allgemeinen nicht leicht Sporen und dann erfolgt die Sporenbildung nicht in allen Zellen, eine Voraussetzung, die gegeben sein müsste, wenn eine Untersuchung zwischen der Bierhefe und der Torula herbeigeführt werden sollte. Ferner waren die Zellen der Bierhefe während der langen Dauer des Versuches (zwei Monate) so geschwächt, dass eine direkte Uebertragung des Bodensatzes der Kulturen auf den Gipsblock von vornherein aussichtslos gewesen wäre. Wenn die Bierhefe zur Sporenbildung gebracht werden sollte, so müsste sie zuerst durch Uebertragnng des Bodensatzes in Würze aufgefrischt werden. Wenn nun zwar Torula 5 dabei nicht vollständig unterdrückt worden wäre,[1]) so würde doch sicherlich das gegenseitige Mengenverhältnis so stark verschoben worden sein, dass auf eine Vermehrung im Bodensatz der Versuchskulturen nicht hätte geschlossen werden können. Einen Einblick hätten vielleicht noch die Einzelkolonien auf festem Nährboden geben können, aber hieran wurde bei der starken Schwächung der Zellen des Bodensatzes abgesehen.

1) H. Will, Beiträge zur Kenntnis der Sporenpilze ohne Sporenbildung etc. Zeitschrift für das gesamte Brauwesen, 1903, XXVI, S. 313 und 1906 XIXX, S. 241.

Beachtenswert ist ferner, dass beim gleichen Grenzwert in der Peptonlösung und im Hefewasser, bei diesem die Haut-, Ring- und Randbildung sowie der Bodensatz viel stärker ist, als in jener. Im Hefewasser ohne Alkoholzusatz ist das Wachstum zuerst ein rascheres, als im Hefewasser mit Alkoholzusatz, später holen jedoch die mit Alkohol versetzten Kulturen die alkoholfreien nicht nur ein, sondern überholen sie um vieles.[1]) Die Haut, sowie der Ring waren viel stärker, die Randbildung viel höher, als in den alkoholfreien Kulturen. Wenngleich also Anfangs der Alkohol die Vermehrung behinderte, so wurde er doch offenbar später als Nährstoff ausgenützt. Um den event. Alkoholverlust, welche die Torula-Arten bei ihrer Vermehrung während der Dauer des Versuches verursachten, festzustellen, wurde in 100 ccm Erlenmeyerkolben 50 ccm Hefewasser mit 2,56 g% Alkohol versetzt mit den Torula-Arten geimpft und bei denselben Verhältnissen, also in Thermostaten bei 25° C unter Watteverschluss zwei Monate stehen gelassen. Der Versuch wurde noch mit einem Parallel-Versuche ausgeführt und zur Kontrolle zwei ungeimpfte Kolben hinzugegeben.

Nach Verlauf zweier Monate wurde der Alkohol von sämtlichen Kolben abdestilliert und refraktometrisch bestimmt. In den vorliegenden Tabellen ist das arithmetische Mittel der Refraktometeranzeigen zweier Parallelversuche angegeben.

	Alkoholgehalt in g. % am 20. VI.	Alkoholgehalt in g. % am 20. VIII.	Alkoholverlust in g. %
Torula 3	2,56	0,77	1,79
„ 4	2,56	0,84	1,72
„ 5	2,56	0,63	1,93
„ 6	2,56	1,05	1,51
„ 11	2,56	0,15	2,41
„ 17	2,56	0,73	1,83
ungeimpfte Kolben:	2,56	1,42	1,14

Obgleich bei den ungeimpften Kolben, wie die Tabelle zeigt, auch eine beträchtliche Alkoholabnahme durch Verdampfung zu verzeichnen ist, so weist doch der grössere Alkoholverlust, hauptsächlich bei Torbula 11, bei den geimpften Kolben, dass die

1) Vergl. H. Will, Handbuch der techn. Mykologie v. Franz Lafar Bd. IV, S. 289.

Torula - Arten den Alkohol in irgend welcher Weise verbraucht haben. Dass Alkohol von Sprosspilzen nicht nur veratmet [1]) wird, sondern auch zum Aufbau des Zelleibes Verwendung findet, ist von den Forschern: Schulz, Meissner, Winogradsky und Kossowicz, bei Kahmhefen bewiesen worden. [2]).

III.

Das Verhalten der Torula-Arten gegenüber organischer Säuren.

Durch diese Versuchsreihe sollte das Verhalten der Organismen gegen verschiedene organische Säuren geprüft werden. Zuerst wurden die Säuremengen festgestellt, bei welchen die Organismen sich noch zu vermehren vermögen. Dazu diente als Nährlösung die schon früher verwendete Peptonlösung Sie wurde auf Freudenreich - Kölbchen von 30 ccm Inhalt in Mengen von je 10 ccm abgefüllt und nach Zusatz von 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 % usw. der zu prüfenden Säure, sterilisiert, später mit einer Platinöse der Torula - Arten geimpft und im Thermostaten bei 25° C aufgestellt. Als Einsaatmaterial dienten 20 - 30 Tage alte Strichkulturen.

Folgende Säuren wurden geprüft: Essigsäure, Weinsäure, Milchsäure, Zitronensäure, Aepfelsäure und Bernsteinsäure.

In der folgenden Tabelle sind die Säuremengen angegeben, bei welchen unter den gebotenen Verhältnissen noch eine Entwicklung der Organismen stattfindet.

Tabelle I.

	Essigsäure in %	Weinsäure in %	Milchsäure in %	Aepfelsäure in %	Zitronensäure in %	Bernsteinsäure in %
Torula 3	0,45	0,7	1,4	1,9	1,9	1,9
„ 4	0,45	0,7	1,4	1,8	1,8	1,9
„ 5	0,50	4,5	2,8	15,0	9,0	gesättigt
„ 6	0,50	0,8	1,2	2,2	2,1	2,3
„ 11	0,50	0,8	1,4	2,2	2,0	2,3
„ 17	0,50	0,8	1,4	2,2	2,0	2,3

Es sind hier die Säuremengen verstanden, bei welchen noch Entwickelung stattfindet.

1) Handbuch der technischen Mykologie von Franz Lafar 1907 Bd. IV. S. S. 18 und 94.

2) Richard Meissner, die Mycoderma. Handbuch der technischen Mykologie von Franz Lafar 1907 Bd. IV. S. 312.

Sie zeigt, dass die Grenze der Säuremengen für die gleiche Säure, bei fast allen Organismen, ungefähr die gleiche ist. Eine Ausnahme bildet nur Torula 5, welche bedeutende Säuremengen vertragen kann. Die grössere Widerstandsfähigkeit gegen Säuren dürfte hier mit der grösseren Widerstandsfähigkeit gegen Alkohol parallel gehen. Ferner ist bemerkenswert, dass bei der Essigsäure schon verhältnismässig geringe Mengen genügen, um die Entwicklung hintan zu halten; hier haben wir die geringsten Prozentzahlen von allen der angewendeten Säuren und ausserdem sind sie für alle Organismen völlig gleich oder nahezu gleich. Auch gegen die Weinsäure sind die Organismen sehr empfindlich, eine Ausnahme macht nur Torula 5. Bei den übrigen Organismen reihen sich die Säuren nach den Grenzzahlen geordnet, folgendermassen an: Essigsäure, Milchsäure, Weinsäure, Zitronensäure, Aepfelsäure und Bernsteinsäure. Bei Torula 5 weicht die Reihenfolge etwas ab: Essigsäure, Milchsäure, Weinsäure, Zitronensäure Aepfelsäure; der Grenzwert für die Bernsteinsäure lässt sich aus dem Grunde nicht bestimmen, weil sie ein geringes Löslichkeitsvermögen hat (5—6 % nach Beilstein); in der gesättigten Lösung war das Wachstum noch ein sehr üppiges. Der Versuch wurde wiederholt, wobei nur solche Säuremengen zugesetzt wurden, welche nahe den Grenzzahlen liegen.

Dieses Verhalten der Organismen gegen organische Säuren ist gar nicht in Einklang zu bringen mit den Dissoziationskonstanten der betreffenden Säuren. Wenn man die Reihenfolge der Grenzzahlen und die Dissoziationskonstanten der Grösse nach geordnet vergleicht, so liegt es auf der Hand, dass die Stärke der Säure für die Entwicklung der Organismen nicht ausschlaggebend ist.

Dissoziationskonstanten der Grösse nach geordnet: [1])		Grenzzahlen für Torula 5:	Grenzzahlen für Torula 3, 4, 6, 11 u. 17:
Weinsäure	0,09700	Essigsäure	Essigsäure
Zitronensäure	0,08200	Milchsäure	Weinsäure
Aepfelsäure	0,03050	Weinsäure	Milchsäure
Milchsäure	0,01380	Zitronensäure	Zitronensäure
Bernsteinsäure	0,00665	Aepfelsäure	Aepfelsäure
Essigsäure	0,00180	(Bernsteinsäure)	Bernsteinsäure

1) Kohlrausch u. Holborn. Leitvermögen der Elektrolyten.

Analoge Versuche mit Torula-Arten sind in der Literatur nicht bekannt, jedoch hat Lafar [1]) solche mit Saccharomyceten in der Weise ausgeführt, dass er zu Most-Essigsäure in Mengen von 0,78%, 0,88% und 1,0% zusetzte. Er fand, dass alle die von ihm geprüften 15 Weinhefearten ziemlich leicht einen Essigsäuregehalt von 0,78%, 14 Arten einen solchen von 0,88% und nur drei Hefen 1,0% Essigsäuregehalt vertragen können.

Für Mycoderma hat Carl Bergsten [2]) folgende Grenzwerte der Essigsäure gefunden:

Temperatur	40°	35°	30°	25°	20°	15°
N.-Essigsäure	9	5	10	15	20	25
Auf % umgerechnet	0%	0,3%	0,6%	0,9%	1,2%	1,5%

In einer zweiten Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob die organischen Säuren, wenn sie in einer Menge vorhanden sind, welche unterhalb des Grenzwertes für die Hemmung der Entwicklung liegt, von den Organismen assimiliert werden. Ferner sollte das Augenmerk darauf gerichtet werden, ob dabei intermediär Milchsäure gebildet wird. Analoge Untersuchungen hat Meissner mit Schimmelpilzen, Kahmhefen, Apiculatus-Arten, Rosahefen und Weinhefen durchgeführt und fand, dass sämtliche von ihm angewandte Säuren von den Organismen aufgezehrt wurden, dass gleichzeitig aber auch aus einigen von ihnen Milchsäure gebildet wurde. [3])

Zur Untersuchung gelangten folgende Säuren: Weinsäure, Aepfelsäure, Zitronensäure, Milchsäure, Bernsteinsäure und Essigsäure.

Der Versuch wurde in folgender Weise angestellt: 1. L. Erlenmeyer-Kolben wurden mit je 500 ccm der bekannten Peptonlösung, welche 0,05% der betreffenden Säure erhielt, gefüllt, durch dreimaliges Aufkochen (das zweite Mal nach 24 Stunden, das dritte Mal nach 48 Stunden) sterilisiert und mit einer Platinöse der entsprechenden Torula-Art geimpft. Das Aussaatmaterial wurde von 12 Tage alten Strichkulturen entnommen. Die Kulturen erhielten ihren Platz auf einem Schrank inmitten der Seitenwände des Laboratoriums. Der Versuch dauerte vom 4. März bis 6 Sep-

1) Lafar, Franz. Studium über den Einfluss organischer Säuren auf Eintritt und Verlauf der Alkohol-Gärung. I. Die Weinhefen und die Essigsäure. Landwirtschaftliche Jahrbücher, Berlin 1895, Bd. 24. S. S. 468 u. 473.

2) Bergsten, Carl. Methode zur Trennung der Mycoderma von den Essig-Bakterien im Bier durch Anhäufung; Wochenschrift für Brauerei 1906. Jahrg. 23. S. 596.

3) Zweiter Bericht der kgl. Württemberg. Weinbau-Versuchsanstalt Weinsberg von Prof. Dr. Meissner. S. 69.

Tabelle IIa.

Torula 3.

Nach Tagen	Weinsäure	Zitronensäure	Aepfelsäure	Bernsteinsäure	Milchsäure
3	—	—	—	Kleine Hautinselchen	—
4	—	Am Rand kleine Hautinselchen	Wie Zitronensäure	Hautinselchen grösser	Wie Zitronensäure
5	—	—	—	In der Mitte grosse Hautinselchen	Wie Bernsteinsäure
7	Am Rand kleine Hautinselchen	—	—	Ganze Oberfläche von einer dünnen Haut überzogen	„ „
9	—	Ganze Oberfläche von einer dünnen Haut überzogen	—	—	—
14	—	—	Beinahe die ganze Oberfläche von einer dünnen Haut überzogen	—	—
16	—	—	Ganze Oberfläche von einer dünnen Haut überzogen	—	—
17	—	—	—	—	—
18	—	—	—	—	—
19	—	—	Ganze Oberfläche von einer dicken Haut überzogen	—	—
21	—	—	—	—	—
44	Am Rand grosse Hautinselchen	—	—	—	Auf der Haut weisse Tüpfelchen
45	Auch in der Mitte Hautinselchen, weiss, durchsichtig	Die Haut hauptsächlich am Rand dick, glatt, weiss	Wie Zitronensäure	Die Haut dünn, am Rand dick, weiss, durchsichtig	Wie Bernsteinsäure
114	Schwacher Bodensatz. Die Häutchen weiss, durchsichtig. Keine Ringbildung.	Starker Bodensatz Mitteldicke Haut, glatt, weiss durchsichtig. Ziemlich starke Ringbildung	„ „	Starker Bodensatz, dünne Haut, glatt, weiss, durchsichtig. Ziemlich starke Ringbildung, weiss	„ „

Tabelle IIb.
Torula 4.

Nach Tagen	Weinsäure	Zitronensäure	Aepfelsäure	Bernsteinsäure	Milchsäure
3	—	—	—	—	Kleine Hautinselchen
4	—	Kleine Hautinselchen	Wie Zitronensäure	Grössere Hautinselchen	Hautinselchen grösser
5	—	Hautinselchen grösser	„ „	Die Hautinselchen haben sich über die ganze Oberfläche vermehrt	Grosse Hautstucke
7	Am Rand und in der Mitte kleine Hautinselchen	Beinahe die ganze Oberfläche von einer dünnen Haut überzogen	„ „	Ganze Oberfläche von einer dünnen Haut überzogen	Wie Bernsteinsäure
9	Beinahe die ganze Oberfläche von einer dünnen Haut überzogen	Die ganze Oberfläche	„ „	—	—
14	—	—	—	—	—
16	—	—	Die Haut dick geworden	Wie Aepfelsäure	Wie Aepfelsäure
17	—	—	Die Haut gekröseartig gefaltet	„ „	„ „
18	—	—	—	—	—
19	—	—	—	—	—
21	—	—	—	—	—
44	—	—	—	—	—
45	Haut dünn, glatt, weiss, durchsichtig. Hohe Randbildung	Haut dünn, glatt, weiss, durchsichtig, wo sie dicker ist, kreideweiss. Hohe Randbildung	Haut sehr dick, kreideweiss. Hohe Randbildg.	Haut dick, grauweiss, hängt in die Nährflüssigkeit strangartig hinein. Schwache Randbildung	Wie Bernsteinsäure
114	Mässiger Bodensatz. Haut dünn, glatt, weiss, durchsichtig. Keine Ringbildg.	Sehr starker Bodensatz. Haut dick, gefaltet, kreideweiss. Schwache Randbildung	Sehr starker Bodensatz. Haut sehr dick, grobgefaltet (die Falten geborsten), grün gefärbt. Schwache Ringbildung	Sehr starker Bodensatz. Haut dick, fein gefaltet (die Falten geborsten), kreideweiss. Schwache Ringbildung	Sehr starker Bodensatz. Haut dick, fein gefaltet (die Falten geborsten), grün gefärbt. Schwache Ringbildung

Tabelle IIc.

Torula 5.

Nach Tagen	Weinsäure	Zitronensäure	Aepfelsäuse	Bernsteinsäure	Milchsäure
3	—	—	—	Kleine Hautinselchen	—
4	—	Am Rand kleine Hautinselchen	Wie Zitronensäure	Sind bedeutend grösser geworden	Wie Zitronensäure
5	Ganze Oberfläche mit kleinen Hautinselchen bedeckt	Ganze Oberfläche mit grösseren Hautinselchen bedeckt	„ „	Ganze Oberfläche von einer Haut überzogen; sehr hohe Randbildung	„ „
7	—	—	—	—	—
9	Ganze Oberfläche von einer dünnen Haut überzogen	Wie Weinsäure	Ganze Oberfläche von einer mässigen Haut überzogen	Wie Weinsäure	Wie Weinsäure
14	—	—	Haut dick geworden	—	Wie Aepfelsäure
16	Haut mässig dick	—	—	—	—
17	—	—	—	—	—
18	—	—	—	—	—
19	—	—	—	—	—
21	—	—	—	—	—
44	—	—	—	—	—
45	Haut dünn, weiss, durchsichtig. Keine Rand- und Ringbildung	Haut dünn, am Rand ziemlich stark, weiss. Hohe Randbildung	Haut stellenweise dick, weiss, durchsichtig, sie hängt strangartig in die Nährflüssigkeit hinein. Hohe Randbildung	Haut in der Mitte dünn, am Rand dick, weiss, durchsichtig, hängt strangartig in die Nährflüssigkeit hinein. Die Haut ist fächerartig gefaltet. Hohe Randbildnng	Haut ziemlich stark, am Rand noch stärker, glatt, grau, weisse Tüpfelchen. Hohe Randbildung
114	Mässiger Bodensatz. Feine Haut, weiss, durchsichtig. Keine Ring- und Randbildung	Mittelst. Bodensatz. Haut mittelst., fein gekräuselt, weiss, durchsichtig. Randbildg. verschwunden, aber dafür zieml. starke Ringb.	Sehr starker Bodensatz. Haut dünn, glatt, weiss, durchsichtig. Randbildung etc. wie Zitronensäure	Starker Bodensatz. Haut dünn, glatt, weiss, durchsichtig. Randbildung etc. wie Zitronensäure	Starker Bodensatz. Haut stark gefaltet (die Falten geborsten), grau. Randbildung etc. wie Zitronensäure

Tabelle IId.

Torula 6.

Nach Tagen	Weinsäure	Zitronensäure	Aepfelsäure	Bernsteinsäure	Milchsäure
3	—	—	—	—	—
4	—	Am Rand kleine Hautinselchen	Wie Zitronensäure	Wie Zitronensäure	Wie Zitronensäure
5	Am Rand kleine Hautinselchen	—	—	—	—
7	—	—	—	—	—
9	—	Am Rand grosse Hautinselchen	Wie Zitronensäure	Ganze Oberfläche von einer dünnen Haut überzogen	Wie Zitronensäure
14	Am Rand grosse Hautinselchen	—	—	—	Ganze Oberfläche von einer dünnen Haut überzogen
16	—	Ganze Oberfläche von einer dünnen Haut überzogen	Beinahe die ganze Oberfläche von einer dünnen Haut überzogen	—	—
17	—	—	—	—	—
18	—	—	—	—	—
19	—	—	—	—	—
21	—	—	—	—	—
44	—	—	—	—	—
45	Am Rand des Gefässes fällt die Haut strangartig zu Boden. Haut glatt, durchsichtig, weiss und ohne Randbildung	Wie Weinsäure	Wie Weinsäure	Wie Weinsäure	Wie Weinsäure
114	Schwacher Bodensatz. Nur am Rand des Gefässes grosse Hautinselchen. Sehr schwache Ringbildung	Ziemlich starker Bodensatz. Dünne Haut über die ganze Oberfläche. Schwache Ringbildung	Wie Zitronensäure	Wie Zitronensäure	Wie Zitronensäure

Tabelle IIe.

Torula 11.

Nach Tagen	Weinsäure	Zitronensäure	Aepfelsäure	Bernsteinsäure	Milchsäure
3	—	—	—	Kleine Hautinselchen	—
4	—	—	—	Hautinselchen grösser	—
5	—	—	—	Beinahe die ganze Oberfläche mit grossen Hautinselchen bedeckt	Am Rand des Gefässes kleine Hautinselchen
7	—	Einzelne grosse Hautinselchen	—	Ganze Oberfläche von einer Haut überzogen	Grosse Hautinselchen
9	—	Ganze Oberfläche von einer Haut überzogen	—	—	Wie Citronensäure
14	Kleine Hautinselchen	—	Grosse Hautinselchen	Dicke Haut	Wie Bernsteinsäure
16	—	—	Dicke Haut über die ganze Oberfläche	—	—
17	—	—	—	—	Haut bekommt wellenförmige Falten
18	—	—	—	—	—
19	—	—	—	—	—
21	—	—	Haut bekommt wellenförmige Falten	—	—
44	—	—	—	—	—
45	Beinahe die ganze Oberfläche von einer dünnen, glatten, durchsichtigen Haut bedeckt. Keine Randbildung	Ganze Oberfläche von einer glatt-runzeligen dicken, weissen Haut überzogen Keine Randbildung	Wie Zitronensäure	Ganze Oberfläche von einer dicken, zottigen, kreideweissen Haut überzogen Keine Randbildung	Wie Bernsteinsäure
114	Schwacher Bodens. Feine durchsichtige Haut bedeckt beinahe die ganze Oberfläche. Keine Ringbildung	Starker Bodensatz. Sehr dicke, runzelige intensiv grün gef. Haut. Schwache Ringbildung	Wie Zitronensäure	Starker Bodensatz. Mittelstarke, zottige, weisse, stellenweise intensivgrün gefärbte Haut. Starke Ringbildung	Starker Bodensatz. Sehr starke, zottige, fein gekräuselte, intensiv grün gefärbte Haut. Mittelstarke Ringbildung.

Tabelle IIf.

Torula 17.

Nach Tagen	Weinsäure	Zitronensäure	Aepfelsäure	Bernsteinsäure	Milchsäure
3	—	Kleine Hautinselchen	Grosse Hautinselchen	Wie Aepfelsäure	Wie Zitronensäure
4	—	Grosse „	—	—	„ „
5	—	Beinahe die ganze Oberfläche von einer dünnen Haut überzogen	—	Wie Zitronensäure	—
7	Am Rand vereinzelte Hautinselchen	Ganze Oberfläche von einer dünnen Haut überzogen	Wie Zitronensäure	„ „	Wie Zitronensäure
9	—	—	—	—	—
14	Grosse Hautinselchen	—	Dicke Haut	—	Wie Aepfelsäure
16	—	Dicke Haut	—	—	—
17	Beinahe die ganze Oberfläche von einer dünnen Haut überzogen	—	Haut wellenförmig gefaltet	—	Wie Aepfelsäure
18	—	—	—	—	—
19	—	—	—	—	—
21	—	—	—	—	—
44	—	—	Die Falten geborsten	—	Wie Aepfelsäure
45	Ganze Oberfläche von einer dünnen, glatten, weissen, durchsichtigen Haut überzogen. Keine Randbildung	Ganze Oberfläche von einer dicken, glatten, weissen, durchsichtigen Haut überzogen; an etlichen Stellen ist sie runzelig und dort kreideweiss. Keine Randbilduug	Ganze Fläche von einer dicken, faltenförmigen (die Falten geborsten), graugelben Haut überzogen, Keine Randbildung	Ganze Fläche von einer dünnen, glatten, weissen, durchsichtigen Haut überzogen. Auf der Haut kreideweisse Tüpfelchen. Hohe Randbildung	„ „
114	Schwacher Bodensatz. Haut dünn, weiss, durchsichtig Keine Ringbildung	Starker Bodenansatz. Haut mässig stark, glatt, weiss, durchsichtig. Schwache Ringbildung	Starker Bodensatz. Haut sehr dick, gefaltet (die Falten geborsten), graugelb, Starke Ringbildung	Starker Bodensatz. Haut dünn, glatt, weiss, durchsicht., mit weiss. Tüpfelchen. Schwache Ringbildung.	Starker Bodensatz. Haut mässig dick, glatt, weiss, durchsichtig. Schwache Ringbildung

Tabelle IIg.

Essigsäure 0,33% mit starker Einsaat.

Nach Tagen	Torula 3	Torula 4	Torula 5	Torula 6	Torula 11	Torula 17
4	Kl. Hautinselchen	—	—	—	—	—
5	—	Kl. Hautinselchen				
6	Hautinselchen gröss.	—	Kl. Hautinselchen	—	Kl. Hautinselchen	Kl. Hautinselchen
9	Grosse Hautstücke	Hautinselchen gröss.	—	—	—	—
15	Beinahe die ganze Oberfläche v. einer dünn. Haut überz.	Grosse Hautstücke	Hautinselchen gröss.	Kl. Hautinselchen	Wie Torula 6	Wie Torula 6
20	Ganze Oberfläche von einer weissen Haut überzogen	Beinahe die ganze Oberfl. von einer weiss. Haut überz.	Wie Torula 4 nur die Haut durchsichtig	Wie Torula 5	Wie Torula 5	Wie Torula 5
30	—	Ganze Oberfl. v. einer weiss. Haut überz.	—	—	—	—
45	Dicke weisse, fein gekräuselte Haut	Wie Torula 3	Ganze Oberfläche v. einer durchsichtigen Haut überz.	—	—	—
47	—	—	—	—	Ganze Fläche von einer durchsichtig. Haut überzogen.	Wie Torula 17
50	—	—	—	Ganze Fläche v. ein. durchsicht. dünnen Haut überzogen	—	—
60	Starker Bodensatz. Dicke, weisse, fein gekräuselte Haut. Starke Ringbildg., weiss	Wie Torula 3	Starker Bodensatz. Feine, durchsichtige, stellenweise grosse weisse dick. Hautpartien, glatte Haut. Nicht über den ganz. Umfang eine zieml. starke Ringbildung weiss	Mässiger Bodensatz. Ziemlich starke, weisse, glatte Haut Ziemlich starke Ringbildg, weiss. Auf d. Haut weisse Tüpfelchen	Ziemlich starker Bodensatz. Feine, durchsichtig Haut Dickere Ringbldg., weiss	Wie Torula 11

tember bei einer Temperatur von 16—18° C. Die Beobachtungen an den einzelnen Kulturen sind in den vorhergehenden Tabellen zusammengefasst. (Siehe die Tabellen IIa, b, c, d, e und f.)

Ausgenommen die Kulturen mit Weinsäurezusatz war das Wachstum in allen übrigen ein sehr üppiges. Unter dem Mikroskop zeigten die Organismen das normale Bild. Hinsichtlich Wachstumschnelligkeit, Aussehen, sowie Form und Ausdehnung der Hautbildung sei auf die Tabellen verwiesen.

In den Tabellen ist die Essigsäure nicht aufgenommen worden. Es wurde nämlich bei sämtlichen Versuchen 0,5 % Säure zugegeben. Dieser Prozent-Gehalt an Essigsäure war für die Organismen zu hoch bemessen, denn im Verlauf von drei Monaten war auf der Oberfläche kein Wachstum zu bemerken, und da nach dem Bodensatze unmöglich auf eine Entwicklung zu schliessen war, so wurde der Kolbeninhalt auf ein Drittel mit destilliertem Wasser verdünnt, also der Säuregehalt auf 0,33 % gebracht, sterilisiert und von Neuem geimpft. Da aber auch diesmal nach Verlauf eines Monats von einer Entwicklung nichts wahrgenommen werden konnte, so wurde ein Versuch mit einer stärkeren Einsaat gemacht. Schon nach 3 Tagen war bei Torula 3 eine Hautentwicklung zu bemerken. Die Einsaat wurde aus 22 Tage alten Strichkulturen entnommen. Der Versuch dauerte zwei Monate. Die Beobachtungen über die äusseren Erscheinungen an den Kulturen sind in der Tabelle IIg zusammengefasst.

Auch in Essigsäure war also die Entwicklung der Organismen eine befriedigende und die mikroskopische Untersuchung ergab, dass das Aussehen der Zellen ein normales war. Schon nach drei Monaten war eine Krystallbildung in der Nährlösung mit Weinsäure am Boden und mit den übrigen Säuren an der unteren Seite der Haut zu bemerken.

Nach Abschluss des Versuches, nach sechs Monaten, entstanden in der Nährlösung mit Weinsteinsäurezusatz gut ausgebildete, durchsichtige, klare, gelb gefärbte, bis 0,2 cm grosse rhombische Krystalle, welche folgende Reaktionen gegeben haben:

1. Mit conc. Schwefelsäure erwärmt zersetzten sie sich unter Kohlensäureentwicklung und Braunfärbung der Schwefelsäure ohne Rückstand. Die Schwefelsäure blieb klar.

2. Im Platintiegel geglüht blieb nach Verkohlung unter Aufblähen und Verbreitung eines brenzlichen Geruches ein rein weisses voluminöses Pulver zurück, das sich in Salzsäure unter Zischen löste.

3. In verdünnter Schwefelsäure löst sich das Pulver nicht auf.

4. Beim Kochen in verdünnter Schwefelsäure lösten sich die Krystalle nicht auf, sie wurden nur undurchsichtig. Nach dem Abkühlen mit überschüssiger Natronlauge gekocht, keine Ammoniak-Entwicklung.

5. Die Lösung der Krystalle oder des Glührückstandes in Salzsäure, bis zum ganz schwachen Geruch mit Ammoniak neutralisiert und mit Ammonoxalat versetzt, gab die Calciumreaktion; das Filtrat mit Ammoniak und Natriumphosphat, keine Magnesiumreaktion.

6. Nach dem Kochen der Krystalle mit Pottasche gibt das mit Essigsäure angesäuerte Filtrat einen krystallinischen weissen Niederschlag von saurem weinsaurem Kalium.

7. Das gleiche Filtrat mit einem Tropfen Kobaltnitrat und einem Tropfen Wasserstoffsuperoxyd versetzt, färbt sich schön grün; beim Erwärmen wird es veilchenblau (Reaktion auf Weinsäure und weinsaure Alkalien nach Vortmann[1]).

8. Weder das geglühte Pulver noch die Krystalle in Salpetersäure gelöst, gaben mit Molybdänlösung eine Phosphorsäure-Reaktion.

Alle Reaktionen beweisen; dass die vorliegenden Krystalle Calciumtartrat waren.

In der Nährlösung mit den übrigen Säuren, ausgenommen Essigsäure, fanden sich gleichmässig zwei verschiedene Krystallformen vor, welche leicht ausgesucht werden konnten, einerseits rhombisch hemimorphe und rhombisch holoedrische, die letzteren mit einer sehr kurzen Achse (flache Krystalle), meistens nicht mit einander verwachsen, anderseits hexagonale Prismen, mit dem einen Ende zu grösseren Krystalldrüsen verwachsen, das andere, freie Ende zu Pyramidenflächen ausgebildet. Die rhombischen waren über 1 cm lang, 0,5 cm breit und 0,1—0,2 cm dick, die hexagonalen ebenfalls über 1 cm lang und 0,1—0,15 cm dick.

Die rhombischen Krystalle zeigten folgende Reaktionen:

1. Im Platintiegel geglüht verkohlten sie nicht, sinterten aber etwas zusammen und wurden grau-schwarz; selbst auf dem Gebläse waren sie nicht weiss zu brennen.

2. Mit conc. Schwefelsäure erwärmt lösten sie sich auf, ohne zu verkohlen und ohne die Schwefelsäure braun zu färben.

3. Die geglühten, sewie die ungeglühten Krystalle gaben in Salpetersäure gelöst mit Molybdänlösung eine starke Phosphorsäure-Reaktion.

1) Vortmann, Analyse der organischen Stoffe. S. 307.

4. Die ungeglühten Krystalle in verdünnter Schwefelsäure gelöst und mit überschüssiger Natronlauge erwärmt, entwickelten Ammoniak.

5. Die Krystalle in Essigsäure gelöst und mit Ammonoxalat versetzt, gaben keine Calcium-Reaktion.

6. In Salzsäure gelöst, mit Ammoniak im Ueberschusse und mit Natriumphosphat versetzt, gaben sie die Magnesium-Reaktion.

Besser ist das Filtrat von der Phosphorsäurebestimmung zu dieser Reaktion zu verwenden.

Die Krystalle sind demnach Magnesium-Ammoniumphosphat, womit auch die Kristallform übereinstimmt. Die Bildung von grossen Krystallen phosphorsaurer Ammoniak-Magnesia hat auch Will in Kartoffelwassergelatine, auf welcher Riesenkolonien der Torula-Arten angesetzt waren, beobachtet.[1])

Die hexagonalen Krystalle zeigten folgende Reaktionen:

1. In conc. Schwefelsäure verkohlten sie nicht, lösten sich aber unter ganz schwacher Braunfärbung der Schwefelsäure auf. Die Braunfärbung ist auf den Einschluss von Zellen aus der Haut, an welcher sie sich bildeten, zurückzuführen; bei der Drüsenform, zu welcher die Krystalle zusammengewachsen waren, waren bei der grössten Sorgfalt die eingeschlossenen Hautpartikelchen nicht wegzubekommen.

2. Im Platintiegel geglüht wurden sie ohne Verkohlung weiss.

3. Die geglühten, wie die ungeglühten Krystalle gaben in Salpetersäure gelöst mit Molybdänlösung eine starke Phosphorsäure-Reaktion.

4. Die ungeglühten Krystalle mit verdünnter Schwefelsäure gekocht, lösten sich nicht auf; mit Natronlauge im Ueberschusse versetzt, entwickelte sie keine Ammoniak.

5. In Essigsäure gelöst und mit Ammonoxalat versezt gaben sie eine Calciumreaktion.

6. Nach dem Entfernen der Phosphorsäure und des Calcium gab das Filtrat mit Ammoniak und Natriumphosphat keine Magnesiumreaktion.

Demnach bestehen die Krystalle aus Calciumphosphat, damit stimmt auch die Kristallform überein.

Die mikrochemische Untersuchung der Kulturen auf Glykogenreaktion[2]) ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

---

1) H. Will, Beiträge zur Kenntnis dar Sprosspilze ohne Sporenbildung etc. Zentralblatt f. Bakteriologie II. Teil 1907. Bd. XVII. S. 437.

2) Vergl. H. Will, Beiträge zur Kenntnis der Sprosspilze ohne Sporenbildung etc. Centralblatt f. Bakt. Abt. II 1907. Bd. XVII. S. 437.

Torula No.	Essigsäure	Weinsäure	Zitronensäure	Aepfelsäure	Bernsteinsäure	Milchsäure
3	Etliche Zellen schwache Glykogenreaktion	Keine Glyklogenreaktion	Wie Weinsäure	Wie Essigsäure	Wie Weinsäure	Wie Essigsäure
4	„ „	Wie Essigsäure	Wie Essigsäure	Keine Glykogenreaktion	Wie Aepfelsäure	Wie Aepfelsäure
5	Deutliche Glykogenreaktion	Keine Glykogenreaktion	Schwache Glykogenreaktion	Wie Zitronensäure	Deutliche Glykogenreaktion	Wie Bernsteinsäure
6	Etliche Zellen schwache Glykogenreaktion	„ „	Wie Weinsäure	Wie Essigsäure	Wie Essigsäure	Wie Weinsäure
11	Starke Glykogenreaktion	Wie Essigsäure	Keine Glykogenreaktion	Wie Zitronensäure	Etliche Zellen deutliche Glykogenreaktion	Wie Bernsteinsäure
17	Etliche Zellen schwache Glykogenreaktion	Wie Essigsäure	Keine Glykogenreaktion	Wie Essigsäure	Wie Essigsäure	Wie Essigsäure

Das chemische Verhalten der Nährlösung nach Abbrechen des Versuches ist folgendes:

Die Nährlösung mit Weinsäure- und Essigsäure-Zusatz

Curcumpapier Rotes Lackmuspapier	unverändert
Blaues „ „	wird rot.

Beim Erwärmen in einem Reagenzrohre für sich keine, mit Alkalien eine Ammoniakentwicklnng.

Die Nährlösung mit den übrigen Säuren:

Curcumpapier	wird braun
Rotes Lackmuspapier	wird blau
Blaues „ „	bleibt unverändert

Beim erwärmen für sich oder mit Alkalien eine Ammoniakentwicklung.

Auch wurde titrimetrisch die Acidität bezw. Alkalität in 10 ccm der Nährlösung mit $^1/_3$ NaOH bezw. $^1/_2$ HCl besimmt und im ersten Falle Phenolphtalein. im zweiten Lackmustinktur als Indikatoren gewählt. Die Nährlösung selbst ohne Säurezusatz hat folgende Acidität: 10 ccm = 1,41 ccm $^1/_2$ NaOH.

Da im Laufe des Versuches die Nährlösung mit Essigsäurezusatz um $^1/_3$ verdünnt wurde, so wurde vor der Titration der bequemeren Bestimmung halber, das Filtrat bis auf 1 Ltr. verdünnt, also auf das Doppelte der ursprünglich angewandten und um mit den anderen vergleichbare Resultate zu bekommen, zur Titration nicht 10 ccm, wie bei den übrigen Säuren, sondern 20 ccm abpipettirt

Zitronensäure, Aepfelsäure, Bernsteinsäure und Milchsäure werden also von den Organismen assimiliert, denn nach Abbrechen des Versuches, wie aus den Tabellen ersichtlich ist, war die Nährlösung sogar alkalisch geworden. Jedenfalls trifft dies auch für die Weinsäure zu, jedoch geht deren Zersetzung offenbar viel langsamer von statten. Allerdings liegt die der Peptonlösung zugesetzte Weinsäuremenge von 0,5 % für die meisten der untersuchten Organismen, nahe der Entwicklungs-hemmenden.

Da aber auch bei Torula 5, für welche in der gleichen Peptonlösung die Entwicklungs-hemmende Menge mehr als das achtfache beträgt, trotzdem aber bei Abschluss des Versuches die noch vorhandene Säure zur Sättigung 2 ccm $^1/_2$ NaOH verlangte, so dürfte die Annahme, dass durch die zugesetzte Säuremenge die Entwicklung der Organismen und damit die Assimilierung gehemmt worden sei, unbegründet sein. Vielmehr würde der Grund der Entwicklungs-Hemmung in der Ausscheidung von

Torula No.	Essigsäure		Weinsäure		Zitronensäure		Aepfelsäure		Bernsteinsäure		Milchsäure	
	Vor Anstellen des Versuches	Nach Abbruch des Versuches	Vor Anstellen des Versuches	Nach Abbruch des Versuches	Vor Anstellen des Versuches	Nach Abbruch des Versuches	Vor Anstellen des Versuches	Nach Abbruch des Versuches	Vor Anstellen des Versuches	Nach Abbruch des Versuches	Vor Anstellen des Versuches	Nach Abbruch des Versuches
	ccm $^1/_2$ n NaOH	ccm $^1/_2$ n NaOH	ccm $^1/_2$ n NaOH	ccm $^1/_2$ n NaOH	ccm $^1/_2$ n NaOH	ccm $^1/_2$ n Hcl	ccm $^1/_2$ n NaOH	ccm $^1/_2$ n Hcl	ccm $^1/_2$ n NaOH	ccm $^1/_2$ n Hcl	ccm $^1/_2$ n NaOH	ccm $^1/_2$ n Hcl
3	3,07	1,0	2,76	2,0	3,1	0,5	2,9	0,3	3,2	0,25	2,5	0,4
4	3,07	1,1	2,76	2,0	3,1	0,6	2,9	0,6	3,2	0,50	2,5	0,5
5	3,07	1,8	2,76	2,0	3,1	0,4	2,9	0,4	3,2	0,50	2,5	0,5
6	3,07	1,2	2,76	2,0	3,1	0,5	2,9	0,3	3,2	0,25	2,5	0,4
11	3,07	1,2	2,76	2,0	3,1	0,5	2,9	0,5	3,2	0,60	2,5	0,6
17	3,07	1,6	2,76	2,0	3,1	0,4	2,9	0,5	3,2	0,20	2,5	0,3

Calcium und damit parallel im Freiwerden der starken anorganischen Säuren zu suchen sein.

Der Frage, ob bei der Zersetzung der Säuren durch die Organismen intermediär Milchsäure gebildet wird, konnte leider nicht näher getreten werden. Erstens deshalb, weil durch mehrere Versuche festgestellt wurde, dass bei dem hohen Peptongehalt der angewandten Nährlösung (2 %) eine auch nur annähernd quantitative Bestimmung der Milchsäure weder nach der Möslingerschen, noch nach der Bleiacetat-Methode möglich ist.

Zweitens, weil, als der Versuch abgeschlossen werden konnte, mit Ausnahme der Weinsäure und Essigsäure, alle übrigen Säuren, also auch intermediär gebildete Milchsäure von den Organismen schon aufgezehrt worden waren. Dass organische Säuren von Hefen[1]) und anderen Pilzen zersetzt und assimiliert, und dass dabei intermediär Milchsäure gebildet wird, hat Meissner[2]) in seinen Versuchen mit Kahmhefen, Weinhefen und Apiculatus-Arten, wie schon oben erwähnt wurde, bewiesen.

IV.

Ueber die Enzymwirkungen der Torula-Arten. Alkoholase, Invertase und andere Enzyme.

Auf Grund der früheren Versuche darf ohne weiteres geschlossen werden, dass die vorliegenden Organismen ohne Ausnahme eine Enzymwirkung besitzen, durch welche die Disaccharide in Monosaccharide zerlegt und dann die letzteren vergoren wurden. Nach der jetzigen Anschauung muss ja ein zusammengesetztes Saccharid vorerst in seine einfacheren Komponenten gespalten werden, wenn es überhaupt vergoren werden soll.

Aus der Versuchsreihe I über das Verhalten der Organismen gegenüber verschiedenen Zuckerarten ist ersichtlich, dass alle ein Enzym, bezw. eine Enzymgruppe enthalten, welche die Monosaccharide in Alkohol und Kohlensäure überführt. Desgleichen besitzen die Organismen alle ohne Ausnahme ein Enzym, welches die Saccharose[3]) spaltet, denn sie wird von allen mehr oder weniger vergoren. Also ist auch die Invertase diesen Organismen eigen. Da Torula 5, 6 und 17 Maltose und Torula 6 und 17 Milchzucker vergären, so erzeugen sie jedenfalls auch die Enzyme

1) Handbuch der technischen Mykologie. Bd. IV. S. 94.

2) II. Bericht der kgl. Württembergischen Weinbau-Versuchsstation Winsberg von Prof. Dr. Meissner. S. 63, oder Handbuch der techn. Mykologie Bd. IV. S. 310.

3) Van Laer, Henri. Sur quelques levures non inversives Zentralblatt für Bakteriologie. II. 1901. Bd. 14. S. 550.

Maltase [1]) und Laktose [2]). Auch ein Trisaccharid-spaltendes Enzym besitzen mindestens Torula 3, 4, 5 und 17, denn schon nach den Ergebnissen der Kleingärmethode wird auch Raffinose wenigstens teilweise von diesen vergoren. Eine Säureinversion ist ausgeschlossen, denn wie früher angegeben, war das zum Gärversuch verwendete Hefewasser absolut neutral.

Die von Will näher beschriebene Verflüssigung der 10prozentigen Würzegelatine durch Torula-Arten [3]) lässt auf die Gegenwart eines tryptischen oder peptanischen Enzyms schliessen. Auch ein Labenzym [4]) sollen die Torulaceen erzeugen. Die von Will beobachtete Schwefelwasserstoffbildung der Torulaceen in Asparagin-Lösung mit Schwefelzusatz [5]) dürfte möglicherweise auch auf eine Enzymwirkung (Pilothion) zurückzuführen sein. Auch lipolytische [6]) Wirkung scheinen einige Arten zu besitzen. Diese wurde bei den untersuchten Torula-Arten nachzuprüfen versucht. Die Gegenwart eines wasserstoffsuperoxydzersetzenden Enzyms [7]) wurde ebenfalls schon bewiesn. Eine diastatische Wirkung der Torulaceen war bisher nicht bekannt, daher wurde diese in erster Linie nachzuweisen versucht.

Diastatische Kraft und Verflüssigung von verkleisterter Stärke.

Zu diesem Versuche wurde von 1½ Monate alten Strichkulturen zunächst der Belag möglichst vollständig abgekratzt und der noch zurückgebliebene Rest mit destilliertem Wasser abgespült. Nach sorgfältigem Zerreiben der Zellenmasse mit Quarzsand, wurde durch einen Gooch'schen Tiegel über Asbest abfiltrirt und das Filtrat auf 30 ccm mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Man bekam so eine beinahe klare, opalisierende, schwach braun gefärbte Flüssigkeit. Von dieser Flüssigkeit erhielten sodann

1) Fischer Emil. Einfluss der Configaration auf die Wirkung der Enzyme Berichte d. deutsch. chem. Gesellschaft 1894. Bd. 27, S. 3479.

2) Ebenda S. 3481.

3) H. Will, Beiträge z. Kenntnis der Sprosspilze ohne Sporenbildung etc. Zentralblatt f. Bakteriologie. II. Abt. 1907, Bd. XVII. S. 704.

4) H. Will, Torulaceen, Rosahefen und schwarze Hefen. Handbuch d. techn. Mykologie v. Franz Lafar 1906, Bd. IV. S. 293.

5) H. Will, Beiträge zur Kenntnis der Sprosspilze ohne Sporenbildung etc. Zentralblatt f. Bakt. II. Abt. 1907, Bd. XVII. S. 707.

6) H. Will, Torulaceen, Rosahefen und schwarze Hefen. Handbuch d. techn. Mykologie von Fr. Lafar 1906, Bd. IV. S. 293 und Rogers, L. A. über d. Ursachen d. in Büchsen verpackten Butter vorkommenden Zersetzungen. Zentralblatt f. Bakt. II. Abt. 1904. Bd. XII. S. S. 388 und 597.

7) Henneberg W. Zeitschrift f. Spiritusindustrie 1804. Bd. 27, S. 96.

11 Reagenzgläser der Reihe nach von 0,1 ccm aufwärts um je $^1/_{10}$ ccm steigende Mengen des Extraktes, bis zu 1,0 ccm.

Mit 1,0 ccm wurden zwei Reagenzgläser beschickt; das eine von diesen wurde 5 Minuten im kochenden Wasser gehalten und ausserdem, um etwa wirksames Enzym völlig zu vernichten, über freiem Feuer aufgekocht. Dann wurden alle Reagenzgläser unter Zusatz von 0,5 ccm Toluol mit 100 ccm einer 2%igen Stärkelösung beschickt u. im Thermostaten bei 25° C. sich selbst überlassen. Nach einer Woche wurde der Versuch unterbrochen. Zur Bestimmung des entstandenen reduzierenden Zuckers erhielt jedes Reagenzglas je 1 ccm Fehling'scher Lösung und wurde dann 10 Minuten im kochenden Wasser gehalten. In keinem Falle trat eine nennenswerte Reduktion ein, abgesehen von einer sehr geringen, welche jedenfalls auf Rechnung der bei Gewinnung der Zellenmasse von den Strichkulturen mit abgespülter Würzegelatine zu setzen ist. Eine Wiederholung des Versuches führte zu dem gleichen negativen Ergebnis. Diastatische Wirkung besitzen also die vorliegenden Torula-Arten nicht.

Ebenso führte der Versuch über das Verflüssigungsvermögen von verkleisterter Stärke zu einem negativen Ergebnis.

Der Versuch wurde genau in der gleichen Weise, wie der zur Bestimmung der diastatischen Kraft ausgeführt, nur anstatt der löslichen Stärke eine 10%ige Kartoffelstärke-Aufschwemmung zugegeben. Nach der Verkleisterung der Stärke bei 65° C. erhielt jedes Reagenzrohr 0,5 ccm Toluol. Selbst nach einem Monat konnte in keinem Falle eine Verflüssigung wahrgenommen werden.

Lipolytisches Enzym.

Ueber die Spaltung von Fett durch Sprosspilze ist bisher nur wenig bekannt. Von manchen Torula-Arten nach der Literatur-Angabe [1]) scheint ein fettspaltendes Enzym ausgeschieden zu werden. Die in Anwendung gebrachten Methoden bedürfen allerdings erst noch einer Nachprüfung.

Zum Nachweis von lipolytischen Enzymen wurde folgende Methode nach Rogers gewählt [2]).

Eine Oese voll einer Emulsion von Butterfett und flüssigem Agar wird auf ein steriles Deckgläschen gegeben, und nachdem der Agar festgeworden ist, diese Emulsion mittelst einer Platinnadel von einer Agar-Strichkultur geimpft

1) Handbuch d. techn. Mykologie v. Fr. Lafar. Bd. IV. S. 293. Rogers, L. A. über die Ursachen d. bei in Büchsen verpackten Butter etc. Zentralblatt f. Bakteriologie, II. Abt. 1904. Bd. XII. S. S. 394, 597.

2) Ebenda. S. 395.

Das Deckgläschen wird sodann auf einen hohlgeschliffenen Objektträger mit Vaselinverschluss aufgelegt. Wenn ein lipolytisches Enzym von den Zellen erzeugt wird und aus diesen austritt, so löst sich das Fett in der Umgebung der Kolonie auf. Infolgedessen ist diese nach einigen Tagen von einer klaren Zone umgeben.

Der Versuch wurde über einen Monat im Thermostaten bei 25° C. beobachtet. Eine klare Zone um die Kolonie war nach Ablauf dieser Zeit jedoch nicht sichtbar. Auch die mikroskopische Untersuchung ergab, dass die ganz nahe an der gut entwickelten Kolonie gelegenen Buttertröpfchen gar nicht angegriffen waren. Das Impfmaterial war aus 7 Tage alten Agarstrichkulturen entnommen worden.

Der Versuch wurde unter Benützung der feuchten Kammer nach Böttcher wiederholt, da möglicher Weise die in dem hohlgeschliffenen Objektträger dargebotene Luftmenge für die sauerstoffbedürftigen Torula-Arten nicht hinreichend war. Das Ergebnis blieb jedoch dasselbe, obgleich bei diesem Versuche sich ziemlich grosse Kolonien entwickelt hatten.

Der Versuch beweist nur, dass ein fettspaltendes Enzym nicht ausserhalb der Zellen wirksam ist. Das schliesst jedoch nicht aus, dass ein solches innerhalb der Zelle bei den Vorgängen des Stoffwechsels tätig ist. Soll der Nachweis auf diesem Wege geführt werden, so müssten sehr grosse Mengen der Organismen in möglichst gleichmässigem, physiologischem Zustande herangezüchtet und diese dann zur Gewinnung des Zellinhaltes zerrieben werden.

Zerlegung von Wasserstoffsuperoxyd.

Ein erster Versuch wurde mit dem Auszug der zerriebenen Zellen ausgeführt.

Von jeder Torula-Art goss man je 2 ccm des erhaltenen Filtrates in kleine Bechergläser und setzte je 2 ccm einer 2%igen Wasserstoffsuperoxyd-Lösung zu. Die Bechergläser erhielten ihren Platz an einem Fenster des Laboratoriums im direkten Licht. Ausserdem wurden zwei Kontrollproben aufgestellt. In der einen waren die 2 ccm des Auszuges aus den zerriebenen Zellen der betreffenden Torula-Art abgekocht und nach dem Erkalten mit 2 ccm Wasserstoffsuperoxyd-Lösung (2%) versetzt worden; zur anderen Kontrollprobe wurden zu den 2 ccm Auszug zunächst 25 ccm Schwefelsäure (1 : 3) und dann erst die 2 ccm Wasserstoffsuperoxyd-Lösung (2%) hinzugefügt, so dass also in beiden Fällen das Enzym unwirksam gemacht worden war. Die

Kontrollproben erhielten ebenfalls ihren Platz am Fenster. Alle Bechergläser waren zum Schutz gegen Staub mit Uhrgläsern bedeckt.

Bei etlichen Auszügen, z. B, Torula 3, 4 und 5 trat sofort nach Hinzufügen von Wasserstoffsuperoxydlösung Sauerstoffentwicklung auf; bei den anderen erst nach Verlauf einiger Zeit, bei den Kontrollproben jedoch niemals.

Nach 12 Stunden wurde der Versuch abgebrochen und die unzersetzte Menge des Wasserstoffsuperoxydes mit $n/_{10}$ Kaliumpermanganatlösung ermittelt.

Da der Versuch nur qualitativ durchgeführt werden sollte, so wurden die verwendeten Reagentien annähernd genau auf die angegebenen Konzentrationen gebracht. Die im Handel befindliche 3%ige Wasserstoffsuperoxyd-Lösung wurde also mit destillirtem Wasser auf die Konzentration von ungefähr 2% gebracht. Durch Auflösung von 3,2 gr. $KMnO_4$ in einem Liter destillirtem Wasser wurde annähernd $n/_{10}$ Kaliumpermanganatlösung hergestellt. Vor der Titration erhielt jedes Becherglas noch einen Zusatz von 25 ccm Schwefelsäure (1 : 3), wodurch das Wasserstoffsuperoxyd zerstörende Enzym unwirksam gemacht und die Flüssigkeit gleichzeitig, die zur Titration notwendige, saure Reaktion erhielt. Auch wurde die Zahl der ccm $n/_{10}$ Kaliumpermanganatlösung ermittelt, welche zur Zersetzung von 2 ccm Wasserstoffsuperoxyd-Lösung notwendig ist. 2 ccm Wasserstoffsuperoxyd-Lösung werden von 23 ccm $n/_{10}$ Kaliumpermanganat Lösung zersetzt. Aus der Tabelle ergeben sich folgende Zahlen für die verbrauchten ccm $n/_{10}$ Kaliumpermanganat-Lösung.

Torula No.	Mit 25 ccm H_2SO_4 1 : 3 versetzt	Gekocht	Ungekocht
3	20,3	21,2	17,6
4	21,8	21,3	18,8
5	20,6	21,9	18,2
6	20,2	21,6	17,5
11	21,7	22,6	20,6
17	21,4	21,7	18,9

Der Versuch wurde mit einem frisch vorbereiteten Auszug wiederholt.

Torula No.	Mit 25 ccm H_2SO_4 1 : 3 versetzt	Gekocht	Ungekocht
3	20,5	20,8	18,4
4	20,0	20,3	15,8
5	20,0	20,4	10,9
6	19,5	19,7	16,2
11	20,2	21,0	19,0
17	20,3	20,8	12,0

Viel bessere Ergebnisse wurden mit in Wasser einfach aufgeschwemmten und nicht zerriebenen Zellenmassen erzielt. Von dieser Aufschwemmung wurden je 2 ccm zum Versuche verwendet, der unter den völlig gleichen Bedingungen zur Ausführung kam.

Torula No.	Mit 25 ccm H_2SO_4 1 : 3 versetzt	Gekocht	Ungekocht
3	21,2	21,4	0,2
4	21,5	21,3	0,2
5	21,3	21,5	0,2
6	21,4	21,2	0,2
11	21,2	21,3	0,2
17	21,3	21,4	0,2

Auch dieser Versuch wurde wiederholt:

Torula No.	Mit 25 ccm H_2SO_4 1 : 3 versetzt	Gekocht	Ungekocht
3	21,0	21,1	0,2
4	21,2	21,0	0,2
5	21,0	21,2	0,2
6	21,1	21,1	0,2
11	21,3	21,0	0,2
17	21,0	21,0	0,2

Aus diesen 4 Tabellen ist deutlich zu sehen, dass die unzerriebenen Zellen eine viel stärkere katalytische Wirkung besitzen, als die zerriebenen. Bei diesen wird höchst wahrscheinlich auch nur der unverletzte Teil der Zellen diese Wirkung hervorrufen. Die sehr schwankenden Zahlen der ersten zwei Tabellen berechtigen wohl zu dieser Annahme.

Bei Torula 11 zeigt der wässerige Auszng in beiden ersten Versuchen keine, bei Benützung der wohl zum grössten Teil unverletzten Zellen, in den beiden letzten eine den anderen Arten gleiche Zersetzung des Wasserstoffsuperoxydes

Farbstoffbildung.

Die Erzeugung von Farbstoffen durch Bakterien und Sprosspilze ist allgemein bekannt[1]; auch bei höherstehenden Pilzen treten Farbstoffe auf. Diese Eigenschaft kann sehr gut als diagnostisches Merkmal verwertet werden.

Schon Will hat bei der Untersuchung der vorliegenden Torula-Arten die Beobachtungen gemacht, dass einige von ihnen Farbstoffe bilden. Bei Torula 3 und 4 trat ein gelber Farbstoff an den Zellen in Hefezuckerwasser allein und in solchem mit einem Zusatz von 0,5% Pepton-Witte, bei Torula 11 in gehopfter und in ungehopfter Bierwürze (Vorderwürze), in Hefezuckerwasser mit einem Zusatz von 0,5% Pepton-Witte[2]) auf. In Milch entstand bei denselben Torula-Arten der gleiche Farbstoff.[3]) An den Riesenkolonien beobachtete Will eine Rosafärbung bei Torula 6.[4]) Die Kulturen, an welchen er seine Studien machte, befanden sich entweder im geschlossenen Schrank oder 3 Meter von einem gegen Nordwest gelegenen Fenster entfernt. Kossowicz hat gefunden, dass Magnesiumsulfat und Kalisalze die Farbstoffbildung bei den Saccaromyceten begünstigen.[5])

Auch bei den vorliegenden Untersuchungen wurde das Auftreten von Farbstoffen beobachtet und wurde hierüber in den betreffenden Versuchsreihen berichtet.

---

1) Lafar Fr., Techn. Mykologie, I. Bd. S. 125—146.

2) H. Will, Beiträge z. Kenntnis d. Sprosspilze ohne Sporenbildung etc. Zentralblatt f. Bakteriologie, Abt. II. 1907. Bd. XVII. S. 90, 137.

3) Ebenda S. 335, 336.

4) Ebenda S. 439.

5) Kossowicz A., Untersuchungen über das Verhalten der Hefen in mineralischen Nährlösungen, I. Mitteilung. Sonderabdruck aus der Zeitschrift f. das landwirtschaftliche Versuchswesen in Oesterreich 1903. S. 2.

Zur Verwendung kamen folgende Nährflüssigkeiten, bezw. feste Nährböden:

1 a Kossowicz-Nährlösung[1])
1 b „ -Gelatine
2 a Peptonzuckerlösung
2 b „ -Gelatine
3 a Hefezuckerwasser
3 b „ „ -Gelatine
4 a Würze (gehopfte)
4 b „ -Gelatine.

Die Versuche wurden in 200 ccm Erlenmeyerkölbchen mit Watteverschluss ausgeführt und zwar für direktes Licht an einem gegen Norden gerichteten Fenster, zum Versuch im Dunkeln aber in einem verschlossenen Kasten bei einer durchschnittlichen Zimmertemperatur von 15—17° C (am Fenster und im Kasten gemessen) aufgestellt.

Die Kölbchen wurden mit je 125 ccm Nährflüssigkeit und mit je 75 ccm Gelatine gefüllt. Auf den festen Nährböden wurden Riesenkolonien angelegt. Massgebend für die Beobachtung von Riesenkolonien war die Tatsache, dass, wenn nur schwache Farbstoffbildung stattfindet, diese an den dichtgehäuften Zellen der Riesenkolonien deutlicher hervortritt, als in den locker gelagerten Zellen, in den Nährflüssigkeiten.

Die mikroskopische Untersuchung des Aussaatmateriales ergab, dass es sich im besten Zustande befand und rein war. Riesenzellen kamen, wie bemerkt sein mag, in Mengen vor, der Eigentümlichkeit jeder Art entsprechend.[2])

In erster Linie kam die gleiche Nährlösung (vergl. S. 5) zur Verwendung, in welcher Kossowicz die Beobachtung von Farbstoffbildung in den Zellen von Saccharomyceten gemacht hat. Ausserdem wurde Würze und Würzegelatine nachgeprüft, welche schon Will angewendet hatte; so auch Hefezuckerwasser. Im übrigen kamen Nährlösungen zur Verwendung, welche von den anderen Versuchen zur Verfügung standen.

1. Versuch mit Kossowicz-Lösung und Gelatine.

Der Versuch wurde nach $4^1/_2$ Monaten unterbrochen, weil die Gelatine angefangen hatte, sich stark zu verflüssigen.

1) Zusammensetzung der Lösung und Literaturangabe. S. 5.

2) H. Will, Beiträge z. Bildung d. Sprosspilze ohne Sporenbildung etc. Zentralblatt f. Bakteriologie, Abt. II. 1907. Bd. XVII. S. 81.

A. Im Dunkeln.

a. Kossowicz-Lösung.

In der Kossowiczlösung hatte die Flüssigkeit keine Färbung angenommen, allerdings war hier auch das Wachstum der Organismen ein sehr geringes; bei Torula 5 und 11 konnte man überhaupt nur mikroskopisch feststellen, dass eine Vermehrung stattgefunden hatte. (Sprossverbände junger Zellen.) Gleichwohl zeigte der vorhandene Bodensatz eine Färbung. Am intensivsten war der Absatz bei Torula 17 und zwar gelblich-grün gefärbt. In gleicher Weise verhielten sich die Kulturen von Torula 3 und 4; etwas schwächer war Torula 6 gefärbt.

b Kossowicz-Gelatine.

Die Gelatine hatte sich am intensivsten bei Torula 3, 4 und 11, etwas schwächer bei Torula 17, ganz schwach bei Torula 6 gefärbt. Bei Torula 5 war kein Farbstoff entstanden. Die Kolonien selbst waren nicht gefärbt, ausgenommen Torula 5, bei welcher die Kolonie rosa gefärbt war.

B. Im direkten Licht.

a. Kossowicz-Lösung.

In keiner der Kulturen war eine Farbstoffbildung zu bemerken.

b. Kossowicz-Gelatine.

Die Gelatine blieb unverändert; auch die Riesenkolonien hatten sich nicht gefärbt.

Anhangsweise sei hier über die Form der Zellen in der Nährlösung und in den Riesenkolonien folgendes bemerkt:

In der Nährlösung stimmte im allgemeinen die Form der Zellen mit den Angaben von Will[1]) überein. Nur bei Torula 6 und 17 kamen auch einzelne langgestrekte Zellen vor. Viel häufiger waren diese in den Riesenkolonien auf Kossowicz-Gelatine und zwar auffallenderweise selbst bei Torula 3 und 4, bei welchen solche Zellen bis jetzt nur sehr vereinzelt und nicht in Sprossverbänden beobachtet worden waren.[2]) Damit ist aber wieder der Beweis erbracht, dass die sogenannten „typischen" Torula-Arten den übrigen Formen dieser Organismengruppe durchaus nicht so schroff gegenüber stehen. Es bedarf bei jenen vielmehr, ebenso wie es bei den übrigen beobachtet wurde, nur besonderer Kulturbedingungen, um die gewöhnliche Kugelform in die Wurstform und selbst in sehr langgestreckte Zellen überzuführen.

1) H. Will, Beiträge z. Bildung d. Sprosspilze ohne Sporenbildung etc. Zentralblatt f. Bakteriologie, Abt. II. 1907. Bd. XVII. S. 81 u. 438.

2) Ebenda.

Die Form der in Riesenkolonien auf Kossowicz-Gelatine gewachsenen Zellen ist folgende:

Torula 3 und 4. In der Mitte der Riesenkolonien gestreckte Form der Zellen nicht selten, Sprossverbände mit verschiedenen Zellformen (die Mutterzelle ist kugelförmig, die nächsten Tochterzellen sind oval, dann schliessen sich gestreckte Zellen an); sehr viel Riesenzellen, welche Glykogenreaktion geben.
Am Rand der Riesenkolonie sehr lang gestreckte Zellen.

Torula 5. In der Riesenkolonie waren die Zellen schon in der Mitte des Belages von überwiegend gestreckter Form, die Randpartie wies solche fast ausschliesslich auf. Ausserdem fanden sich, wie schon früher angegeben, Apiculatus-ähnliche[1]) und verzerrte, abnorme Zellen vor, letztere in Form von Riesenzellen; ziemlich intensive Glykogenreaktion, die hauptsächlich den Riesenzellen eigen ist.

Auch bei Torula 6 war schon früher[2]) das Vorkommen von vereinzelten wurstförmigen Zellen festgestellt worden. In der Zentralpartie der vorliegenden Riesenkolonie fanden sich dagegen sehr viel langgestreckte, teilweise abnorme Zellformen, welche im Zusammenhange mit den früheren Angaben[3]), offenbar eine Eigentümlichkeit der Torula 6 sind. Am Rande der Riesenkolonie überwogen auch hier wieder langgestreckte Zellen. Etliche Riesenzellen zeigten Glykogenreaktion.

Torula 11 besass die gleichen Zellformen bei gleicher Verteilung in der Riesenkolonie, wie Torula 6. Deutliche Glykogenreaktion.

Die Zellen von Torula 17 verhielten sich in den Riesenkolonien den früheren Beobachtungen entsprechend.[4]) In der Mitte des Belages glichen sie der Einsaat, am Rande fanden sich nur etliche gestreckte Zellen neben viel Riesenzellen vor, welche Glykogenreaktion gaben.

---

1) H. Will, Beiträge z. Kenntnis d. Sprosspilze ohne Sporenbildung etc. Zentralblatt f. Bakteriologie, Abt. II. 1907. Bd. XVII. S. 81 u. 441.

2) H. Will, Beiträge z. Kenntnis d. Sprosspilze ohne Sporenbildung etc. Zentralblatt f. Bakteriologie, Abt. II. 1907. Bd. XVII. S. 81 u. 439.

3) Ebenda.

4) H. Will, Beiträge z. Kenntnis d. Sprosspilze ohne Sporenbildung etc. Zentralblatt f. Bakteriologie, Abt. II. 1907. Bd. XVII. S. 80 u. 440.

Tabelle I.

Torula No.	Im Dunkeln		Im gedämpften Licht		Im direkten Licht	
	Hefezuckerwasser	Hefezuckergelatine	Hefezuckerwasser	Hefezuckergelatine	Hefezuckerwasser	Hefezuckergelatine
3	Flüssigkeit intensiv gelb-grün gefärbt und fluoresziert deutlich. Bodensatz wie Bierhefe gefärbt	Gelatine gleichmässig intensiv gelb-grün gefärbt, deutliche Fluoreszenz. Kolonie wie Bierhefe gefärbt	Flüssigkeit intensiv gelb-grün gefärbt, aber schwächer als im Dunkeln. Bodensatz wie Bierhefe gefärbt. Schwache Fluoreszenz	Gelatine gleichmässig intensiv gelb-grün gefärbt, aber schwächer als im Dunkeln; schwach Fluoreszenz. Kolonie wie Bierhefe gefärbt	Flüssigkeit unverändert. Bodensatz wie Bierhefe gefärbt	Gelatine schwach gelb gefärbt; keine Fluoreszenz. Kolonie wie Bierhefe gefärbt
4	Wie Torula 3	Wie Torula 3	Wie Torula 3	Wie Torula 3	Flüssigkeit gelb gefärbt. Bodensatz wie Torula 3	Gelatine gleichmässig orange-gelb gefärbt; kein. Fluoreszenz. Kolonie wie Torula 3
5	Flüssigkeit unverändert. Bodensatz wie Torula 3	Gelatine unverändert. Kolonie rosa gefärbt	Flüssigkeit unverändert. Bodensatz wie Torula 3	Gelatine unverändert. Kolonie rosa gefärbt	Wie Torula 3	Gelatine unverändert. Kolonie weiss
6	Flüssigkeit schwach gelb gefärbt; keine Fluoreszenz. Bodensatz wie Torula 3	Gelatine gleichmässig schwach gelb gefärbt; keine Fluoreszenz. Kolonie wie Torula 3	Flüssigkeit deutlich gelb-grün gefärbt; keine Fluoreszenz. Bodensatz wie Torula 3	Gelatine gleichmässig schwach gelb gefärbt; keine Fluoreszenz. Kolonie wie Torula 3	Wie Torula 3	Gelatine gleichmässig ganz schwach gelb gefärbt; keine Fluoreszenz. Kolonie wie Torula 3
11	Wie Torula 6	Wie Torula 3. Kolonie weiss	Wie Torula 6	Gelatine gleichmässig deutlich gelb-grün gefärbt; schwache Fluoreszenz. Kolonie weiss	Wie Torula 3	Gelatine gleichmässig orange-gelb gefärbt; kein. Fluoreszenz. Kolonie wie Torula 3
17	Wie Torula 6	Wie Torula 6	Wie Torula 6	Wie Torula 6	Wie Torula 3	Wie Torula 6

Tabelle II.

Torula No.	Im Dunkeln		Im gedämpften Licht		Im direkten Licht	
	Peptonzucker-wasser	Peptonzucker-gelatine	Peptonzucker-wasser	Peptonzucker-gelatine	Peptonzucker-wasser	Peptonzucker-gelatine
3	Flüssigkeit intensiv gelb-grün gefärbt; deutliche Fluorescenz. Bodensatz wie Bierhefe gefärbt	Gelatine gleichmässig intensiv gelb-grün gefärbt; starke Fluorescenz. Kolonie wie Bierhefe gefärbt	Flüssigkeit schwach braun gefärbt; aber auch die gelb-grüne Farbe schimmert durch; keine Fluorescenz. Bodensatz wie Bierhefe gefärbt	Gelatine gleichmässig rotbraun gefärbt, aber nicht so intensiv wie am direkten Licht; deutliche Fluorescenz. Kolonie wie Bierhefe gefärbt	Flüssigkeit intensiv braun gefärbt. Keine Fluorescenz. Bodensatz wie Bierhefe gefärbt	Gelatine gleichmässig intensiv rotbraun gefärbt; keine Fluorescenz Kolonie wie Bierhefe gefärbt
4	Wie Torula 3 nur Färbung etwas intensiver	Wie Torula 3 nur Färbung etwas intensiver	Wie Torula 3	Wie Torula 3	Wie Torula 3	Wie Torula 3
5	Flüssigkeit unverändert Bodensatz wie Torula 3	Gelatine unverändert. Kolonie rosa gefärbt	Flüssigkeit ganz schwach braun gefärbt; keine Fluorescenz. Bodensatz wie Torula 3	Gelatine gleichmässig rotbraun gefärbt, am schwächsten von allen; keine Fluorescenz. Kolonie rosa gefärbt	Wie Torula 3, aber die Farbe deutlich schwächer als bei allen anderen Kulturen	Wie Torula 3, aber die Farbe deutlich schwächer als bei den anderen Kulturen

(Fortsetzung der Tabelle II siehe Seite 61.

Tabelle II. (Fortsetzung).

Torula No.	Im Dunkeln		Im gedämpften Licht		Im direkten Licht	
	Peptonzucker-wasser	Peptonzucker-gelatine	Peptonzucker-wasser	Peptonzucker-gelatine	Peptonzucker-wasser	Peptonzucker-gelatine
6	Flüssigkeit deutlich gelb-grün gefärbt; keine Fluorescenz. Bodensatz wie Torula 3	Gelatine gleichmässig deutlich gelb-grün gefärbt; keine Fluorescenz. Kolonie wie Torula 3	Flüssigkeit schwach braun gefärbt, die gelb-grüne Farbe ist nicht wahrzunehmen; keine Fluorescenz. Bodensatz wie Torula 3	Wie Torula 3, etwas schwächer u. keine Fluorescenz	Wie Torula 3 nur die Farbe etwas schwächer	Wie Torula 3, nur die Farbe etwas schwächer
11	Flüssigkeit intensiv gelb-grün gefärbt, aber weniger intensiv als Torula 3; keine Fluorescenz. Bodensatz wie Torula 3	Wie Torula 3, aber Färbung u. Fluorescenz etwas schwächer	Wie Torula 3	Wie Torula 3	Wie Torula 3 nur die Farbe schwächer, aber stärker als bei Torula 6	Wie Torula 3, nur die Farbe schwächer, aber stärker als bei Torula 6
17	Flüssigkeit deutlich gelb-grün gefärbt; keine Fluorescenz. Bodensatz wie Torula 3	Wie Torula ?, aber Färbung u. Fluorescenz noch schwächer als bei Torula 11	Wie Torula 6 etwas intensiver	Wie Torula 6. Kolonie rosa gefärbt	Wie Torula 3. Die Intensität der Farbe = Torula 6	Wie Torula 6, vielleicht etwas intensiver

2 Versuch mit Hefezuckerwasser und Hefezuckerwasser-Gelatine.

In diesem Versuche trat sehr deutliche Farbstoffbildung auf

Die Kulturen wurden in direktem Licht auf dem Fenster, in gedämpftem Licht auf einem Tisch an der den Fenstern entgegengesetzten Seite des Zimmers und im Dunkeln im verschlossenen Kasten aufgestellt. Zu jeder Versuchsreihe wurde noch ein ungeimpfter Kolben zur Kontrolle zugegeben.

Versuchsdauer 3 Monate.

Die Beobachtungen sind in den vorstehenden Tabellen zusammengefasst.

3. Versuch mit Peptonzuckerlösung und Peptonzucker-Gelatine.

Sehr interessante Farbstoffbildung und Fluorescenz trat bei Peptonlösung und noch schöner in Peptongelatine auf.

Der Versuch wurde im direkten Licht und im Dunkeln unter denselben Bedingungen, wie der vorhergehende ausgeführt.

Dauer des Versuches ebenfalls 3 Monate.

In der folgenden Tabelle sind auch die späteren Beobachtungen im gedämpften Licht mit aufgenommen.

Nach der mikroskopischen Untersuchung waren die Kulturen rein, die Organismen selbst unverändert gegenüber der Einsaat.

Die schöne intensiv gelb-grüne Farbe und die starke Fluorescenz bei etlichen Arten, welche die im Dunkeln gehaltene Peptonzuckergelatine aufwies, bot nichts überraschendes, denn bei dem vorhergehenden Versuche, wie bei vielen anderen [1]) war die gleiche Färbung schon beobachtet worden. Um so überraschender war dagegen das Auftreten der braunen Farbe in der Peptonlösung und der rotbraunen in der Peptongelatine im direkten Licht. Der Verdacht, dass sie ohne Mitwirkung der Organismen in der Peptonlösung bezw. Peptongelatine allein unter der Einwirkung des Lichtes entsteht, wurde durch das Auftreten dieser Farben auch bei Torula 5 verstärkt, wo sonst in keinem einzigen Versuch eine Neigung zur Farbstoffbildung zu bemerken war; im Gegenteil wurde diese gehemmt oder ganz unterdrückt. Aus diesem Grunde wurde daher der Versuch mit der Peptonlösung und der Peptongelatine wiederholt mit der Abänderung, dass Kulturen auch im gedämpften Licht in der Mitte des Zimmers

1) Vergl. I, Tab. I, II; Tab. I, II u. III; Tab. IIb u. IIe.

aufgestellt und jeder Versuchsreihe noch ungeimpfte Kolben zur Kontrolle beigegeben wurden.

Dauer des Versuches 3 Monate.

Schon nach zwei Wochen war zu bemerken, dass auch ungeimpfte Kolben sich braun bezw. rotbraun färben. Damit war bewiesen, dass die angewandte Peptonlösug bezw. Peptongelatine schon für sich allein die Eigenschaft besass, am Licht sich zu färben, und dass die Färbung keineswegs unter dem Einfluss der Organismen erfolgte. Gleichwohl dürfte die verschiedene Intensität der Färbuug nicht ganz ohne Mitwirkung der Organismen zustande gekommen sein. In Uebereinstimmung mit den Beobachtungen der übrigen Versuchsreihen war nämlich die Färbung bei Torula 3 und 4 am intensivsten; dann folgender Reihe nach Torula 11, 17 und 6; am schwächsten war die Färbung bei Torula 5.

Die Beobachtungen an den Kulturen, welche im Dunkeln und im direkten Licht aufgestellt wurden, decken sich mit den früher gemachten vollkommen; die Beobachtungen an solchen, welche im gedämpften Licht aufgestellt wurden, sind in der Tabelle II aufgenommen worden. Die ungeimpften Kolben im Dunkeln blieben unverändert, im gedämpften und im direkten Licht, haben sich jedoch am intensivsten braun (mit Peptonzucker-Lösung) und rotbraun (mit Petonzuckergelatine) gefärbt

Die Parallelkulturen des zweiten Versuches mit Peptonzuckerlösung und Peptonzuckergelatine wurden vom Licht in's Dunkle und umgekehrt vom Dunkeln an's Licht gebracht.

Der Versuch dauerte 3 Monate (insgesamt also 6 Monate aufgestellt).

Das Ergebnis war folgendes:

Die vom Dunkeln an's Licht gebrachten Kulturen hatten ihre intensiv grüne Farbe und Flourescenz verloren und sich braun (Peptonlösung) bezw. rotbraun (Peptongelatine) die ungeimpften Kolben dagegen braun bezw. rotbraun gefärbt.

Die vom Licht ins Dunkle gebrachten hatten dagegen ihre braune bezw. rotbraune Farbe beibehalten und ausserdem fluorescierten sie (Torula 3, 4 und 11 in der Peptonlösung und Torula 3, 4, 11 und 17 in der Peptongelatine).

Die ungeimpften Kolben blieben unverändert. Aus diesem Versuche geht wieder hervor, dass die braune Färbung bezw. rotbraune Färbung unabhängig, die Fluorescenzerscheinungen dagegen abhängig von den Organismen sind.

Aus den vorstehenden Versuchen ist ersichtlich:

1. Dass mehrere Organismen Farbstoffe erzeugen, von welchen die Fähigkeit, Farbstoffe in bestimmten Nährlösungen zu bilden, bisher nicht bekannt war; denn wenn die Färbung der Nährlösung ohne Einsaat unverändert bleibt, dann muss, wenn Farbstoff entsteht, dieser durch die betreffenden Organismen erzeugt worden sein.

2. Es werden fluorescierende Farbstoffe gebildet.

3. Die Farbstoffbildung tritt jedoch viel häufiger in der Umgebung der Zellkolonien (Bodensatz und Riesenkolonien) auf, als an oder in den Zellen der Organismen selbst [1]). Vergl. Versuch I Tabelle I und Versuch III Tabelle Ib und Ie.

4. Volles Licht hemmt die Farbstoffbildung oder verlangsamt sie wenigstens bedeutend.

5. Im gedämpften Licht tritt die Farbstoffbildung schon deutlicher hervor.

6 Am intensivsten ist die Farbstoffbildung im Dunkeln.

Die Beobachtungen über die Wachstumserscheinungen in Milch, Würze und Würzegelatine, welche schon Will angestellt hat, wurden nachgeprüft.

Neues, hinsichtlich der Farbstoffbildung ergab sich dabei nicht [2]).

Zum Schlusse soll hier nur die Zunahme der Acidität der Milch, während der Versuchsdauer angeführt werden, welche nebenbei ermittelt wurde:

In der vorliegenden Tabelle bedeuten die Zahlen ccm n/2 NaOH, welche der Acidität in 10 ccm der Milch entsprechen; als Indikator wurde Phenolphtaleïn gewählt.

Datum	ungeimpfte Kolben	Torula 3	Torula 4	Torula 5	Torula 6	Torula 11	Torula 17
30. IX.	0,35						
15. X.	0,35	0,5	0,8	0,7	0,7	0,7	0,5
24. X.	0,40	1,0	0,9	0,8	0,8	0,9	0,6
14. XI.	0,40	1,2	1,0	1,0	0,8	2,3	0,6

1) H. Will, Beiträge z. Kenntnis d. Sprosspilze ohne Sporenbildung etc. Zentralblatt f. Bakteriologie, Abt. II. 1907. Bd. XVII. S. 137 u. 335.

2) H. Will, Beiträge z. Kenntnis d. Sprosspilze ohne Sporenbildung etc. Zentralblatt f. Bakteriologie, Abt II. 1907. Bd. XVII. S. 89, 90, 137—139, 333—336.

Zusammenfassung.

Die Ergebnisse der vorstehenden Untersuchung kurz zusammengefasst sind folgende:

1. Ausser den schon von Will geprüften Zuckerarten werden von den meisten Torula-Arten auch noch Raffinose bei Anwendung der Kleingärmethode vergoren, Arabinose dagegen nicht. Der Kleingärmethode kommt jedoch nur der Wert eines orientierenden Versuches zu, da bei Gärversuchen in grösserem Massstabe und von längerer Dauer schwerer vergärbarer Zuckerarten, wie Milchzucker, zerlegt werden. Torula 6 spaltet bei diesem Versucch alle angewendeten Zucker, Torula 11 Dextrose, Lävulose, Galaktose und Saccharose, Torula 17 noch Milchzucker.

2. Während der alkoholischen Gärung wird durch die Torula-Arten wie durch die Saccharomyceten Säure gebildet.

3. Alkoholzusatz zur Nährlösung wirkt in bestimmten Mengen hemmend auf die Entwicklung ein. Die Grenzwerte sind für die verschiedenen Torula-Arten in der gleichen Nährlösung nicht immer gleich.

4. Alkoholzusatz zur Nährlösung unterhalb des Grenzwertes hemmt zwar anfangs die Entwicklung etwas, später jedoch begünstigte er sie Der Alkohol dient zum Aufbau der Zellen. Säure entsteht in den Nährlösungen nachweisbar nicht.

5. Mit Ausnahme von Torula 5 vertragen alle übrigen Arten in der Nahrlösung die gleiche Menge organischer Säuren. Diese ordnen sich nach ihrer Schädlichkeit für die Organismen in aufsteigender Linie wie folgt:

Bernsteinsäure, Aepfelsäure, Zitronensäure, Milchsäure, Weinsäure und Essigsäure. Für Essigsäure ist der Grenzwert in allen Fällen der gleiche.

6. Sämtliche Torula-Arten zersetzen die der Nährlösung zugesetzten organischen Säuren.

7. Nach den bisherigen Versuchsergebnissen scheinen die geprüften Torula-Arten weder ein diastatisches noch ein stärkelösendes Enzym zu erzeugen. Lipase konnte ebenfalls nicht nach gewiesen werden. Dagegen erzeugen sie Katalase.

8. Alle Torula-Arten bilden in verschiedenen Nährlösungen Farbstoffe und zwar auch solche, bei welchen bisher diese Eigenschaft nicht bekannt war. Die Farbstoffe gehen häufiger in die Nährlösung über und rufen hier Fluorescenzerscheinungen hervor. Seltener bleiben sie an den Zellen haften.

9. Das Licht wirkt hemmend auf die Bildung der Farbstoffe ein, oder unterdrückt diese völlig. Die Fluorescenzerscheinungen hören unter dem Einfluss des direkten Lichtes auf.